

Uzročnici nastanka tekлина na hrastu lužnjaku (*Quercus robur* L.) u klonskoj sjemenskoj plantaži Petkovac (UŠP Vinkovci)

Prskalo, Sara

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Forestry / Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:108:555984>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-31**



Repository / Repozitorij:

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



ŠUMARSKI FAKULTET SVEUČILIŠTA U ZAGREBU
ŠUMARSKI ODSJEK
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ
URBANO ŠUMARSTVO, ZAŠTITA PRIRODE I OKOLIŠA

SARA PRSKALO

**UZROČNICI NASTANKA TEKLINA NA HRASTU
LUŽNJAKU (*Quercus robur* L.) U KLONSKOJ
SJEMENSKOJ PLANTAŽI PETKOVAC (UŠP VINKOVCI)**

DIPLOMSKI RAD

ZAGREB, 2019.

ŠUMARSKI FAKULTET SVEUČILIŠTA U ZAGREBU
ŠUMARSKI ODSJEK

UZROČNICI NASTANKA TEKLINA NA HRASTU LUŽNJAKU
(*Quercus robur* L.) U KLONSKOJ SJEMENSKOJ PLANTAŽI
PETKOVAC (UŠP VINKOVCI)

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

Studentica: Sara Prskalo

JMBAG: 0068218897

Broj indeksa: 932/17

Datum odobrenja teme: 25.4.2019.

Datum predaje rada: 10.9.2019.

Datum obrane rada: 27.9.2019.

Zagreb, rujan 2019.

Dokumentacijska kartica

Naslov	Uzročnici nastanka teklina na hrastu lužnjaku (<i>Quercus robur</i> L.) u klonskoj sjemenskoj plantaži Petkovac (UŠP Vinkovci)
Title	Causative agents of bleeding lesions on penduculate oak (<i>Quercus robur</i> L.) in clonal seed orchard Petkovac (FA Vinkovci)
Autor	Sara Prskalo
Adresa autora	Vjekoslava Karasa 25, Đakovo
Mjesto izrade	Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Vrsta objave	Diplomski rad
Mentor	prof. dr. sc. Danko Diminić
Komentorica	dr. sc. Jelena Kranjec Orlović
Izradu rada pomogao	doc. dr. sc. Milivoj Franjević
Godina objave	2019.
Obujam	31 stranica, 28 slika, 3 tablice, 1 graf, 31 literaturna referenca
Ključne riječi	hrast lužnjak, sjemenska plantaža, teklina, UŠP Vinkovci
Key words	penduculate oak, seed orchard, bleeding lesions, FA Vinkovci
Sažetak	<p>Tijekom 2018. godine su na hrastu lužnjaku u klonskoj sjemenskoj plantaži Petkovac na donjim dijelovima debla primijećeni simptomi curenja biljnih sokova na kori, takozvane teklinae. Cilj ovog istraživanja je utvrditi prisutnost gljiva i gljivama sličnih organizama u simptomatičnom tkivu drva i kore te okolnom tlu kao potencijalnom izvoru infekcije. Prisutni patogeni organizmi će biti izolirani iz simptomatičnog tkiva i tla na hranjive podloge te potom identificirani molekularnim metodama.</p>

	IZJAVA O IZVORNOSTI RADA	OB ŠF 05 07
		Revizija: 1
		Datum: 28.6.2017.

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

Sara Prskalo

U Zagrebu, 27. 9. 2019.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Hrast lužnjak (<i>Q. robur</i> L.) i njegovo značenje u Hrvatskoj	1
1.2. Biljne bolesti i štetnici hrasta lužnjaka	3
1.3. Značaj klonskih sjemenskih plantaža (KSP) u šumarstvu.....	8
2. CILJ RADA.....	10
3. MATERIJALI I METODE.....	11
3.1. Područje istraživanja.....	11
3.2. Uzorkovanje na terenu.....	12
3.3. Izolacija micelija gljiva i gljivama sličnih organizama	13
3.4. Identifikacija dobivenih micelija molekularnim metodama.....	14
4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA.....	18
4.1. Prikaz dobivenih taksona prema bazi gena NCBI GenBank	18
5. RASPRAVA.....	20
5.1. Uloga gljive <i>Fusarium solani</i> u odumiranju stabala u KSP Petkovac	20
5.2. Uloga ostalih vrsta gljiva pronađenih na stablima KSP Petkovac	22
6. ZAKLJUČAK.....	28
7. LITERATURA	29

Popis slika

- Slika 1. Areal hrasta lužnjaka (<http://www.hkisdt.hr>)
- Slika 2. Spačvanska šuma (<https://sites.google.com>)
- Slika 3. Hrastova pepelnica (*Microsphaera alphitoides*) (<https://stetnici.sumins.hr>)
- Slika 4. Mednjača (*Armillaria mellea*) (<https://depositphotos.com>)
- Slika 5. Površina lica lužnjakova lista sa simptomima oštećenja od hrastove mrežaste stjenice (Hrašovec, B. et al.)
- Slika 6. Jedan imago i dvije ličinke hrastove mrežaste stjenice na naličju lužnjakova lista (Hrašovec, B. et al.)
- Slika 7. Nekroza na listu rododendrona zaraženog vrstom *Phytophthora Ramorum*
- Slika 8. Prikaz tekлина na hrastovom stablu, KSP Petkovac
- Slika 9. Klonska sjemenska plantaža „Petkovac“, UŠP Vinkovci
- Slika 10. Položaj klonske sjemenske plantaže „Petkovac“
- Slika 11. Uzimanje uzoraka na terenu
- Slika 12. Izgled pojedinog uzorka
- Slika 13. Prikaz laminarnog kabineta i potrebnog pribora za izolaciju gljiva i njima sličnih organizama iz biljnog tkiva
- Slika 14. Dijelovi biljnog tkiva uronjeni u hranjivu podlogu
- Slika 15. Uzgoj izolata na PDA hranjivoj podlozi na sterilnim celofanskim diskovima
- Slika 16. Uređaj za određivanje težine micelija
- Slika 17. Uređaj TissueLyser za homogenizaciju tkiva
- Slika 18. Prikaz obrade kromatograma dobivenih sekvenciranjem u računalnom programu BioEdit Sequence Alignment Editor
- Slika 19. Prikaz usporedbe obrađene sekvence s postojećima u bazi gena NCBI GenBank primjenom algoritma BLAST
- Slika 20. Miceliji vrste *Fusarium solani* na PDA hranjivoj podlozi
- Slika 21. Micelij *Penicillium* sp. na PDA hranjivoj podlozi
- Slika 22. Micelij vrste *Bjerkandera adusta* na PDA hranjivoj podlozi
- Slika 23. Micelij *Periconia* sp. na PDA hranjivoj podlozi
- Slika 24. Micelij vrste *Monocillium tenue* na PDA hranjivoj podlozi
- Slika 25. Micelij vrste *Epicoccum nigrum* na PDA hranjivoj podlozi
- Slika 26. Micelij vrste *Coniothyrium carteri* na PDA hranjivoj podlozi
- Slika 27. Micelij vrste *Paraconiothyrium brasiliense* na PDA hranjivoj podlozi
- Slika 28. Micelij *Cadophora* sp. na PDA hranjivoj podlozi

Popis tablica

Tablica 1. Sastav smjese za izvođenje PCR reakcije

Tablica 2. Uvjeti lančane reakcije polimerazom

Tablica 3. Tablica dobivenih taksona gljiva u KSP Petkovac identificiranih prema GenBank bazi gena

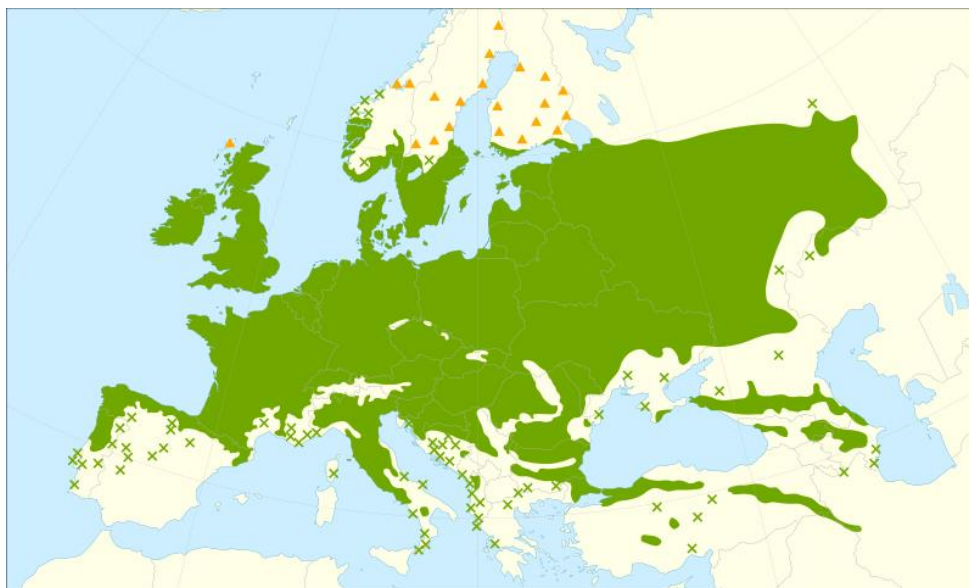
Popis grafova

Graf 1. Prikaz odnosa broja izoliranih stabala i onih na kojima je pronađena vrsta *Fusarium solani*

1. UVOD

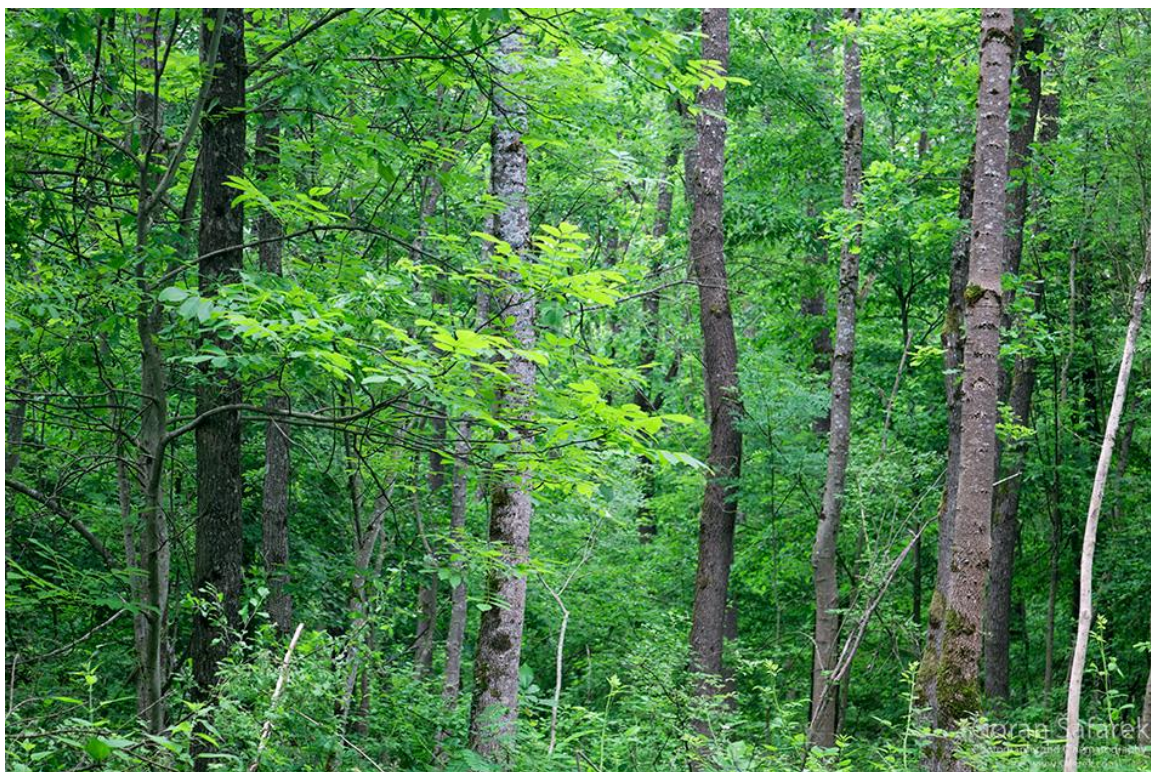
1.1. Hrast lužnjak (*Q. robur* L.) i njegovo značenje u Hrvatskoj

Hrast lužnjak (*Quercus robur* L.) je vrlo raširena vrsta drveća gotovo cijele Europe, Kavkaza i Male Azije (Slika 1). To je listopadna vrsta koja raste na dubokim, glinastim ili pjeskovitim, plodnim, pretežno vlažnim tlima s visokom razinom podzemne vode. Tvori čiste lužnjakove šume kao i mješovite sastojine s običnim grabom, poljskim jasenom i drugim vrstama (<http://www.haop.hr>). Spačvanski bazen predstavlja cjelovit i najveći kompleks šuma hrasta lužnjaka u Hrvatskoj i u Europi (Slika 2). Rasprostire se u najistočnijem dijelu Hrvatske, između rijeka Save i Dunava, na području rijeke Bosut i njezinih pritoka Spačve, Studve, Ljubnja i Breznice. Površina šuma Spačve iznosi 39 789 ha, što čini petinu svih lužnjakovih šuma u Hrvatskoj (Klepac 2002). Hrast lužnjak je klimatogena vrsta drveća te tvori trajne šumske zajednice. Klimatogene zajednice razvijaju se na staništu obilježenom lokalnim klimatskim, pedološkim, orografskim i biotskim prilikama (Matić 1989, 2009, Prpić 1996, Matić i dr. 1998). Prema Šumskogospodarskoj osnovi područja Republike Hrvatske hrast lužnjak zauzima površinu od 210 259 ha ili 8,7 % (Milković 2006). U Hrvatskoj hrast lužnjak tvori ekološki vrlo značajne šumske zajednice koje su staništa brojnih ugroženih i/ili zaštićenih biljnih, životinjskih i gljivljih vrsta. Ekološki učinak šuma hrasta lužnjaka iznimno je velik, posebice s obzirom na antierozijsku i hidrološku ulogu (<http://www.haop.hr>).



Slika 1. Areal hrasta lužnjaka (<https://es.wikipedia.org>)

Uz običnu jelu hrast lužnjak je najugroženija vrsta drveća u Hrvatskoj. Značajnije sušenje lužnjaka započelo je odumiranjem nizinskog brijesta (zbog holandske bolesti), te višekratnih jakih napada štetnika i bolesti (gubar, zlatokraj, kukavičji suznik i dr.) u prvoj polovici 20. stoljeća. U novije vrijeme sušenje lužnjaka izravna je posljedica neprimjerenih vodotehničkih zahvata (izgradnja kanala, nasipa i dr.), a u razloge ugroženosti spadaju i neodgovarajuća primjena mehanizacije u iskorištavanju šuma, zanemarivanje odvodnje pri gradnji šumskih cesta, klimatske promjene, onečišćena poplavna voda, imisijska acidifikacija (kisele kiše i suho taloženje), automobilski promet, intenzivna poljoprivreda, primjena pesticida u šumama, odlagališta otpada i dr. (<http://www.haop.hr>). U današnjim uvjetima narušene ravnoteže u ekosustavima što je uzrokovano promjenama režima vlaženja površinskim i podzemnim vodama, onečišćenjem zraka, vode i tla te klimatskim promjenama, vitalitet sastojina i stabala značajno je narušen (Kalafadžić i dr. 1993, Prpić 1996).



Slika 2. Spačvanska šuma (<http://prirodahrvatske.com>)

1.2. Biljne bolesti i štetnici hrasta lužnjaka

Budući da je odumiranje hrasta lužnjaka posljedica sinkroniziranog djelovanja više štetnih čimbenika, mnogi od njih stvaraju predispoziciju stabala za napad patogenih gljiva, koje time također postaju jedan od čimbenika u ovome procesu. Ovdje se osvrćemo na one najvažnije i najčešće, koje imaju određenu ulogu u sušenju hrastovih stabala (Harapin i Androić, 1996).

Hrastova pepelnica (*Microsphaera alphitoides* Grif. et Maubl.) (Slika 3) gljivični je organizam koji napada većinu vrsta hrastova južne Europe. Prvi simptomi napada pepelnice uočavaju se krajem svibnja i početkom lipnja na mladim listovima vršnih izbojaka. Prvo se pojave male bijele mrlje, koje se šire i međusobno povezuju i konačno mogu prekriti cijelu površinu lista, pa čak i dio mladog zelenog izbojka. Napad pepelnice slabijeg intenziteta ne uzrokuje veće štete, ali kod jakog napada oštećuje se velik dio lista, što uzrokuje slabljenje stabala i gubitak drveta. Još teža situacija nastupa ako se defolijacija stabala javlja nekoliko godina zaredom. Tada hrastova stabla slabe te ih napadaju mednjača (*Armillaria mellea* Karst.), druge ksilofagne gljive i kukci. Zbog narušenih ekoloških uvjeta staništa i djelovanja čitavog niza negativnih biotskih i abiotskih čimbenika sve je češći izostanak uroda žira, ponik propada u šumi, sastojine se progaljuju pa obnova i podizanje hrastovih sastojina postaju sve veći problem (Harapin i Androić, 1996).



Slika 3. Hrastova pepelnica (*Microsphaera alphitoides*) (<https://stetnici.sumins.hr>)

Mednjača (*Armillaria mellea* /Vahl. et Fr./ Karst.) (Slika 4) uz hrastovu pepelnicu spada u najvažnija gljivična oboljenja hrasta lužnjaka. U nas izrazite štete mednjača čini u šumama hrasta lužnjaka, u kojima se uz druge štetne čimbenike (klimatske promjene, defolijacija, hrastova pepelnica) javlja posljednja u nizu i uzrokuje sušenje pojedinih stabala, skupina stabala, pa i čitavih sastojina. Budući da je mednjača patogen koji dolazi iz tla, gotovo su nemoguće mjere suzbijanja širokih razmjera. Stoga u lancu biotskih uzročnika sušenja hrasta lužnjaka možemo intervenirati i suzbijati jedino prva dva čimbenika: uzročnika defolijacije i hrastovu pepelnicu (Harapin i Androić 1996).



Slika 4. Mednjača (*Armillaria mellea*) (<https://alchetron.com>)

Hrastova mrežasta stjenica (*Corythucha arcuata* Say, 1832) je invazivni štetnik koji se u Hrvatskoj pojavio 2014. godine, od kada se značajno proširio i radi velike štete na lišću, te ga se povezuje i sa smanjenim urodom hrasta. Uglavnom dolazi na lišću hrastova, najčešće na hrastu lužnjaku (*Quercus robur* L.), a uočena je i na lišću nizinskog brijesta (*Ulmus minor* Mill.), divlje jabuke (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) i u manjoj mjeri kupine (*Rubus* sp.). Većinom obitava na donjoj strani lista (Slika 5). Radi se o pravom štetniku hrastova lišća, čija se štetnost očituje u žućenju, klorotičnim promjenama (Slika 6), sušenju i preranom opadanju lišća. Štete od vrste *Corythucha arcuata* mogu povećati fiziološku osjetljivost stabala na napade drugih štetnih kukaca

i bolesti, a nije isključen i povećani aditivni utjecaj polutanata (Rabitsch 2008, 2010, Dobrova i dr. 2013). Napadnuta stabla gubljenjem klorofila se sve teže hrane, a time su i manje otporna na negativne utjecaje okoliša. Štetnost se ogleda u sisanju lisnih sokova i razaranju klorofila, zbog čega list gubi zelenu boju, postaje svjetliji, potom žućkast i crvenkastosmeđ. Razlika u boji se najbolje vidi ako se pokraj hrastovih stabala nalaze jasenova, grabova ili klenova stabla, koja su i dalje potpuno zelena. U svakom slučaju, riječ je o štetniku velikog biotičkog potencijala (Posarić, 2013).



Slika 5. Jedan imago i dvije ličinke hrastove mrežaste stjenice na naličju lužnjakova lista (Hrašovec, 2013)



Slika 6. Površina lica lužnjakova lista sa simptomima oštećenja od hrastove mrežaste stjenice (Hrašovec, 2013)

Phytophthora sp. - zadnjih nekoliko godina *Phytophthora sp.* predstavljaju popriličnu prijetnju šumskom drveću i prirodnim ekosustavima europskih država. Smatra se da njihovom širenju pogoduje slaba kontrola transporta (uvoza/izvoza) sadnica te da su izvori širenja upravo rasadnici (Brasier i Jung 2006). Njihovo napredovanje se povezuje i s klimatskim ekstremima, koji bi im mogli pogodovati u smislu povećanja vlage, ali i fiziološkog slabljenja biljaka (izmjena sušnih i vlažnih ekstrema); (Pernek et al. 2011). Jung i dr. (1996) napominju kako su blage zime te povećana depozicija dušika posljednjih godina zasigurno imali utjecaj na širenje i aktivnost vrsta roda *Phytophthora* u tlu.

Vrste pseudogljiva *Phytophthora* koje inficiraju putem tla prve će simptome izazvati na korijenju te donjem dijelu debla zaraženog domaćina, što je češći način zaraze, dok vrste koje se šire zrakom mogu prvotne simptome izazvati u krošnji, odnosno na lišću domaćina. Istraživanjima je utvrđeno da su prvi simptomi koji ukazuju na zarazu kloroza, nekroza (Slika 7) i otpadanje lišća, te osutost krošnje. Nedugo nakon pojave prvih simptoma (u proljeće i ljeto) javljaju se karakteristični simptomi ove vrste - tamne teklina iz kojih se slijeva tamna tekućina. Ispod teklina nalaze se rakaste tvorevine koje obuhvaćaju kambijalno tkivo, čime blokiraju provodne elemente i stablu se smanjuje vitalitet.



Slika 7. Nekroza na listu rododendrona zaraženog vrstom *Phytophthora ramorum*

Phytophthora quercina je vrlo agresivna gljiva koja je pronađena na hrastu lužnjaku, kitnjaku, meduncu, ceru i crniki. Dokazana je povezanost ove vrste i stabala s oštećenom krošnjom, dok na zdravim stablima nije pronađena. Ova gljiva remeti vodni potencijal napadnute biljke, uništava korjenove dlačice te remeti transpiraciju i fotosintezu same biljke.

Vrsta *Phytophthora cambivora* pronađena je na kori joha (*Alnus sp.*), hrastova (*Quercus sp.*) i drugih drvenastih vrsta (Brasier i Kirk, 2001).

Ostale pronađene vrste roda *Phytophthora* u Hrvatskoj su: *Phytophthora alni* koja dolazi na johi, *Phytophthora gonapodyides* i *Phytophthora cactorum*.

Tekline- tamni, smeđi do crni sokovi koje se javljaju uglavnom u obliku nepravilnog kruga na kori stabla. Osim vrsta roda *Phytophthora*, veliku ulogu u stvaranju tekline imaju i bakterije. One prirodno imaju vrlo veliko područje rasprostranjenosti pa se tako nalaze u tlu i zraku. Bakterije iz tla biljka može upiti kroz korijenski sustav ili ih mogu donijeti kukci na svome tijelu. Kada bakterije dospiju u stablo one se brzo dijele i fermentacijom proizvode razne plinove koji stvaraju pritisak na koru i ona se raspucava. Iz raspucanih rana biljni sokovi izlaze na površinu kore, zajedno s dijelom bakterija. Tekline su bogate ugljikohidratima i time privlače kukce, stoga su oni u najvećem broju slučajeva samo simptom, ne uzročnik slabljenja ili odumiranja stabla. U nekim slučajevima uzrok tekline mogu biti mehaničke ozljede ili bušotine nastale od kukaca.



Slika 8. Prikaz tekline na hrastovom stablu, KSP Petkovac

1.3. Značaj klonskih sjemenskih plantaža (KSP) u šumarstvu

Odavno je poznata činjenica kako kvalitetna biljka može izrasti samo iz kvalitetnog sjemena. U šumarstvu se sjemenarstvo nalazi u novoj fazi razvoja, a to je proizvodnja i uporaba selekcioniranog šumskog sjemena proizvedenog u klonskim sjemenskim plantažama (Slika 9) i sjemenskim objektima. U novonastalim narušenim ekološkim uvjetima (biotski čimbenici, zračne i vodene polucije, pad razine podzemne vode, izgradnja infrastrukturnih objekata itd.) dolazi do izostanka redovitog uroda sjemena, a to rezultira izostankom obnove i pomlađivanja sastojina. Zbog svih tih razloga morat će se intenzivnije pristupiti proizvodnji kvalitetnog selekcioniranog šumskog sjemena. Neosporno je kako će se podizanjem sjemenskih plantaža doprinijeti povećanju kvalitete željenog šumskog sjemena, ali kako bi se to uspješno obavilo moraju se riješiti još mnogi tehnički problemi da bi ta proizvodnja bila što ekonomičnija (Littvay, 2017).

Sjemenske su plantaže najvažnija poveznica između operativne šumarske prakse s jedne strane i oplemenjivanja i pratećih znanstvenih istraživanja s druge. Njihova je važnost višestruka: stvaranje izvora reprodukcijskog materijala prilagođenog promijenjenim klimatskim, stanišnim i gospodarskim uvjetima, koji će biti potreban budućim generacijama te služiti kao važan čimbenik u očuvanju genetske raznolikosti. Uloga sjemenskih plantaža i njihov udio u europskom i svjetskom šumarstvu u projekciji je svih budućih prihodovanja iz gospodarenja šumama. U znanstvenom smislu sjemenske plantaže i gospodarenje svim njihovim tipovima doživljavaju se kao već usvojena znanost, u kojoj vodeću ulogu preuzima praksa, a ne znanstvenici (Lindgren, 2007).

Sjemenske plantaže mogu biti generativne (sadržavaju potomstvo selekcioniranih superiornih stabala, bilo iz slobodnog ili iz kontroliranog oprašivanja) ili klonske (sadržavaju heterovegetativno selekcionirana superiorna stabla). Koncept klonskih sjemenskih plantaža (KSP) zamišljen je tako da se fenotipski najbolja stabla, tzv. plus stabla, u plantaži međusobno oprašuju i oplođuju, ostvarujući na taj način genetsku dobit od 10 % i više (Vidaković 1996, Vidaković i dr. 2000).

U Hrvatskoj se započelo s osnivanjem klonskih sjemenskih plantaža već prije više desetljeća, i to ponajprije u znanstvene svrhe radi stjecanja iskustva (Vidaković 1996). U Hrvatskoj postoje tri klonske sjemenske plantaže hrasta lužnjaka. Površinom najveća (26 ha) smještena je na području UŠP Bjelovar, šumarije Čazma,

a osnovana je 2001. godine. Druga po veličini je klonska sjemenska plantaža Petkovac o kojoj će u nastavku biti više riječi. Najstarija KSP hrasta lužnjaka u Hrvatskoj je osnovana 1996. te smještena na području UŠP Našice, šumarije Orahovica, s površinom od 18,4 ha.

Uz navedene klonske sjemenske plantaže hrasta lužnjaka osnovani su i testovi potomstava za utvrđivanje genetske kvalitete selekcioniranih plus stabala (Vidaković i dr. 2000).



Slika 9. Klonska sjemenska plantaža „Petkovac“, UŠP Vinkovci

2. CILJ RADA

Sušenje hrasta lužnjaka uzrokuju različiti abiotiski i biotski čimbenici. Najznačajniji među njima su gljivični organizmi kao biotski čimbenici. Oni uzrokuju odumiranje stanica i dijelova tkiva ili čitavih organa uz promjene boje, razgradnju tkiva ili trulež, deformacije, sušenje, mumifikaciju itd. (Glavaš, 1999).

U klonskoj sjemenskoj plantaži Petkovac (UŠP Vinkovci) uočena je pojava žućenja listova i odumiranja dijelova ili cijelih stabala hrasta lužnjaka te takozvanih tekлина na deblu.

Kao mogući uzrok odumiranja stabala istraživani su gljivični i njima slični organizmi u teklinama na donjem dijelu stabala. Cilj ovog istraživanja bio je izolacijom na hranjive podloge dobiti čiste kulture gljiva i gljivama sličnih organizama koji mogu biti odgovorni za nastanak tekлина i odumiranje hrasta u plantaži te ih identificirati molekularnim metodama.

Utvrđivanje prisutnosti potencijalno štetnih vrsta gljiva i njima sličnih organizama u simptomatičnom tkivu je važno kao temelj za odabir odgovarajućih mjera zaštite kako bi se pokušalo spasiti stabla od odumiranja ili fiziološkog slabljenja.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Područje istraživanja

Istraživanje je provedeno u ožujku, 2019. godine u klonskoj sjemenskoj plantaži Petkovac, na deset stabala koja su pokazivala simptome teklina na donjem dijelu debla.

Klonska sjemenska plantaža „Petkovac“ (Slika 10) osnovana je u proljeće 2000. godine u šumariji Otok (lokalitet Petkovac, UŠP Vinkovci), s ciljem proizvodnje kvalitetnog hrastovog sjemena u što kraćim vremenskim razmacima. Površina na kojoj se prostire plantaža Petkovac iznosi 29,5 ha, od kojih je 25 ha produktivne površine. Prije same sadnje na plantaži su obavljani pripremni radovi, jer je plantaža podignuta na nekadašnjoj poljoprivrednoj površini. Uslijedilo je određivanje razmaka sadnje i trasiranje redova za sadnju. Sadnja se obavlja po shemi koju je postavio Zavod za šumarsku genetiku, dendrologiju i botaniku Šumarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. U proljeće 2000. godine posađeno je prvih 699 rameta. Nakon sadnje u ožujku 2009. godine na plantaži se nalazi 2 390 rameta. Konačni broj rameta na plantaži trebao bi biti 3 142. Svake godine intenzivno se provode radovi na njezi i zaštiti klonova od različitih biotskih i abiotskih faktora. Sve su biljke obrojčane te je tako moguće pratiti njihov razvoj unutar plantaže. Oko plantaže podignuta je žičana ograda i zasađen zeleni zaštitni pojas koji čine Lawsonov pačempres (*Chamaecyparis lawsoniana* (A.Murray Parl), obična smreka (*Picea abies* (L.) H. Karst.) i malolisna lipa (*Tilia cordata* Mill.) (Šimunić i Nemeš, 2009).



Slika 10. Položaj klonske sjemenske plantaže Petkovac

3.2. Uzorkovanje na terenu

Uzorci na terenu prikupljeni su 28. ožujka 2019. godine u KSP Petkovac, tijekom jutarnjih sati.

Na terenu su uzimani uzorci s deset odabranih stabala na kojima su uočene tamne tekline uglavnom na donjem dijelu debla. Uzorci su uzimani sjekirom (Slika 11) u području prijelaza simptomatičnog u zdravo drvo i koru. Uzeti uzorci su bili duljine 5-10 centimetara, debljine 1-2 centimetar (Slika 12), uzimao se dio zaražene kore zajedno sa zaraženim dijelom drva. Poslije svakog uzimanja uzorka alat je steriliziran 96 %-tnim etanolom. Odmah po uzimanju uzorci su umotani u papirnati ručnik i stavljeni u papirnate vrećice da ne bi došlo do isušivanja, te su tako omotani pohranjivani u rashladnu torbu.



Slika 11. Uzimanje uzoraka na terenu



Slika 12. Izgled pojedinog uzorka

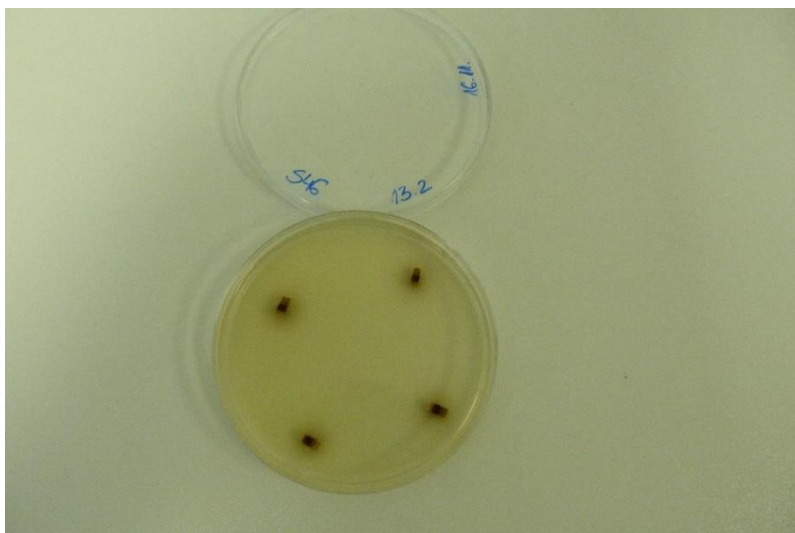
3.3. Izolacija micelija gljiva i gljivama sličnih organizama

Uzorci su obrađeni u Laboratoriju za patologiju drveća Zavoda za zaštitu šuma i lovno gospodarenje na Šumarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu unutar 24 sata od uzimanja istih na terenu. Radna površina, to jest unutrašnjost laminarnog mikrobiološkog kabineta za rad u atmosferi čistog zraka (u daljnjem tekstu: laminarni kabinet), očišćena je pomoću etanola i papirnatoг ručnika. Sav pribor za rad (daska za rezanje, dva skalpela, dvije manje pincete, velika pinceta, čaše za sterilizaciju, papirnati ručnici) izložen je UV svjetlu na 30 minuta (Slika 13).

Uzorci s terena površinski su sterilizirani kako bi se uklonile nečistoće i dobili uzorci koji se mogu koristiti dalje u laboratorijskom istraživanju. Uzorci veličine 5-7 centimetara sterilizirani su potapanjem u 70 %-tnom etanolu 30-60 sekundi. Poslije sterilizacije uzorci su isprani u sterilnoj destiliranoj vodi 10-20 sekundi i ostavljeni da se osuše na papirnatim ručnicima. Od tako steriliziranih uzoraka rezani su manji komadi (oko 5 milimetara), tako da se pokuša uzeti rubni zaraženi i zdravi dio. Rezanje na manje dijelove rađeno je pomoću steriliziranog skalpela. Izrezani manji dijelovi uranjani su do pola svoje visine u hranjivu podlogu PDA (Potato Dextrose Agar) i CMA (Corn Meal Agar) u Petrijeve zdjelice (4 komada u Petrijevu zdjelicu promjera 90 mm) (Slika 14). Na svaku Petrijevu zdjelicu napisan je datum obrade uzoraka, redni broj stabla i naziv hranjive podloge. Petrijeve zdjelice inkubirane su u tami na temperaturi od 19- 21 °C u komori rasta, te je praćen rast gljiva i drugih organizama u njima. Dobiveni miceliji su redovito presađivani u nove Petrijeve zdjelice kako bi se dobile čiste kulture.



Slika 13. Prikaz laminarnog kabineta i potrebnog pribora za izolaciju gljiva i njima sličnih organizama iz biljnog tkiva



Slika 14. Dijelovi biljnog tkiva uronjeni u hranjivu podlogu

3.4. Identifikacija dobivenih micelija molekularnim metodama

Dobivene čiste kulture micelija su na temelju morfoloških značajki promatranih golim okom i mikroskopom (Olympus BX41) grupirane u morfotipove. Promatrane morfološke značajke su uključivale boju i teksturu micelija, obojenje hranjive podloge, boju na poleđini Petrijeve zdjelice, brzinu rasta, te veličinu, boju i oblik spora ukoliko su bile prisutne. Za utvrđene morfotipove je odabran jedan reprezentativni izolat za identifikaciju vrste molekularnim metodama.

Izolacija DNA iz micelija je vršena fenol-kloroform metodom (Ježić i sur. 2012) uz određene prilagodbe (Kranjec i sur. 2017). Izolati su uzgojeni na PDA (Potato Dextrose Agar, ThermoFisher Scientific, SAD) hranjivim podlogama na sterilnim celofanskim diskovima (Slika 15) (Cellophane Membrane Backing, Bio-Rad, SAD) u tami na 21 °C.

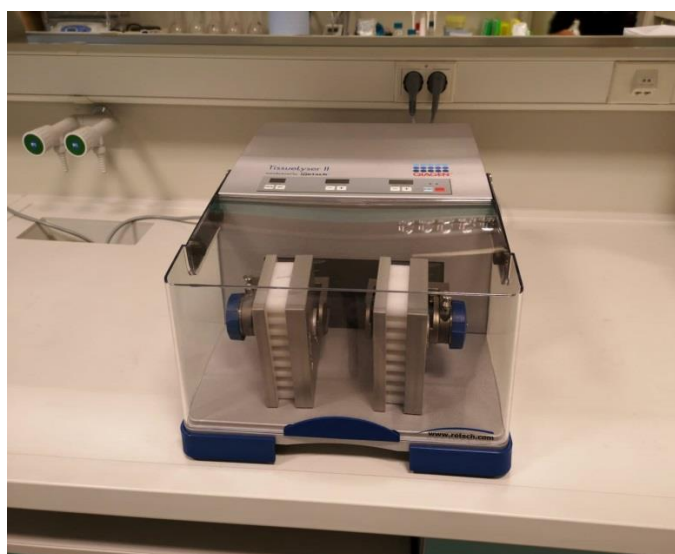


Slika 15. Uzgoj izolata na PDA hranjivoj podlozi na sterilnim celofanskim diskovima

Približno 50 mg micelija starog sedam dana je odvagano za svaki izolat (Slika 16). Tkivo je homogenizirano u mikroepruvetama pomoću uređaja TissueLyser (Slika 17). U lančanoj reakciji polimerazom (PCR) je umnažana ITS regija izolirane genomske DNA (Schoch i sur. 2012) korištenjem početnica ITS1-F (5'CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA 3') (Gardes i Bruns 1993) i ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') (White i sur. 1990). Konačne koncentracije pojedinih sastojaka smjese za PCR (Tablica 1) te uvjeti reakcije (Tablica 2) su određene prema Bakys i sur. (2009).



Slika 16. Uređaj za određivanje mase micelija



Slika 17. Uređaj TissueLyser za homogenizaciju tkiva

Tablica 1. Sastav smjese za izvođenje PCR reakcije

Sastojak*	Početna koncentracija	Konačna koncentracija za reakciju	Volumen za 1 reakciju (μl)
Taq DNA polimeraza	5 U/μl	1 U/35 μl	0,2
početnica ITS1-F	10 μM	0,2 μM	0,7
početnica ITS4	10 μM	0,2 μM	0,7
dNTP smjesa	10 mM	0,2 mM	0,7
MgCl ₂	25 mM	2,75 mM	3,85
pufer za PCR	10 x	1 x	3,5
sterilna H ₂ O	-	-	24,35
DNA kalup	-	3-90 ng/μl	1
Ukupno			35

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

Tablica 2. Uvjeti lančane reakcije polimerazom

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

Sve PCR reakcije su se izvodile na uređaju Eppendorf AG Mastercycler EP Gradient u pojedinačnom volumenu od 35 µl. Tijekom svakog izvođenja reakcije je uključena i negativna kontrola (1 µl sterilne H₂O umjesto DNA kalupa). Dobiveni PCR produkti su nakon provjere elektroforezom u agaroznom gelu bili pohranjeni na -20 °C do pripreme za slanje na određivanje slijeda nukleotida (sekvenciranje).

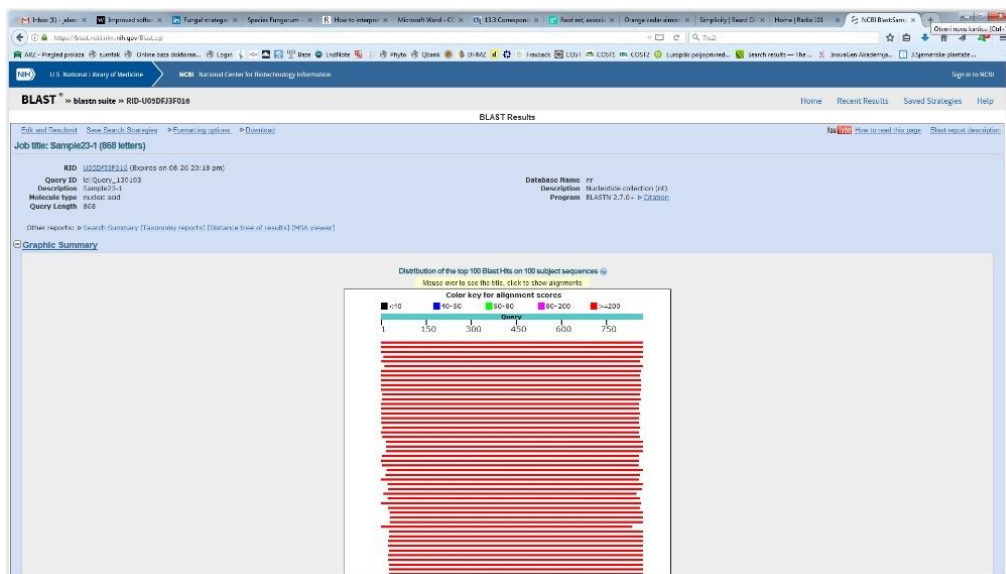
Specifičnost, duljina (pb) te približna koncentracija dobivenih PCR produkata su provjereni elektroforezom u 1,5 % agaroznom gelu pri naponu od 55 V te u trajanju od 90 minuta. U gel se prethodno dodavala boja za vizualizaciju nukleinskih kiselina GelStar Nucleic Acid Gel Stain (Lonza Rockland, SAD) konačne koncentracije 1x. U jažice gela je nanošeno po 1 µl svakog PCR produkta pomiješanog s 4 µl sterilne destilirane vode (razrjeđenje zbog visoke koncentracije dobivenih produkata) te 1 µl pufera za nanošenje uzoraka (6x DNA Loading Buffer, TransGen Biotech, Kina). Tijekom svake izvođene elektroforeze je u jednu od jažica nanošen molekularni marker poznate veličine (100 bp DNA Ladder, TransGen Biotech, Kina) radi procjene duljine i koncentracije PCR produkata. Nakon završene elektroforeze su PCR produkti na gelu vizualizirani, fotografirani pomoću UV transiluminatora s kamerom (Bio-Imaging Systems DNR, MiniBIS Pro) te računalnog programa GelCapture.

Izolacija genomske DNA iz odabranih čistih kultura micelija te umnažanje ciljanih sekvenci (ITS regije) u lančanoj reakciji polimerazom (PCR) izvršeni su u Molekularno-biološkom laboratoriju Zavoda za šumarsku genetiku, dendrologiju i botaniku na Šumarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Dobiveni nepročišćeni PCR produkti su slani u Macrogen Europe (Amsterdam, Nizozemska) na sekvenciranje. Kromatogrami dobiveni sekvenciranjem su provjereni i obrađeni u računalnom programu BioEdit Sequence Alignment Editor (Slika 18) v.7.2.5 (Hall 1999).



Slika 18. Prikaz obrade kromatograma dobivenih sekvenciranjem u računalnom programu BioEdit Sequence Alignment Editor

Izolati su identificirani usporedbom obrađenih sekvenci s postojećima u bazi gena NCBI GenBank primjenom algoritma BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Slika 19) (Altschul i sur. 1990). Za identifikaciju na razini vrste su u obzir uzimane sekvence s podudarnošću od najmanje 98 % na najmanje 80 % duljine ispitivane sekvence, dok su one s podudarnošću od 94 – 97 % na također najmanje 80 % duljine ispitivane sekvence korištene za identifikaciju na razini roda ili druge više taksonomske jedinice (Bakys i sur. 2009). Znanstveni nazivi taksona preuzeti su s mrežne stranice www.indexfungorum.org.



Slika 19. Prikaz usporedbe obrađene sekvence s postojećima u bazi gena NCBI GenBank primjenom algoritma BLAST

4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

4.1. Prikaz dobivenih taksona prema bazi gena NCBI GenBank

Na temelju prethodnih istraživanja dobiveni su rezultati koji će biti prikazani u ovom poglavlju rada.

U nastavku je prikazana tablica dobivenih vrsta i rodova istraživanih gljiva i gljivama sličnih organizama prema NCBI GenBank (Tablica 3).

Tablica 3. Tablica dobivenih taksona gljiva u KSP Petkovac identificiranih prema GenBank bazi gena

Stablo broj	Oznaka uzorka	Broj izoliranih micelija	Identificirani takson prema NCBI GenBank	Pokrivenost sekvence (%)	Podudarnost sekvenci (%)
1	M2	4	<i>Fusarium solani</i>	100	99,64
2	M3	4	<i>Fusarium</i> sp.	100	99,82
3	M5	3	<i>Bjerkandera adusta</i>	100	99,84
	M6	1	<i>Fusarium solani</i>	100	99,46
	M7	2	<i>Fusarium solani</i>	100	99,64
4	M8	1	<i>Penicillium</i> sp.	100	99,82
	M10	4	<i>Fusarium solani</i>	100	99,64
5	M11	1	<i>Periconia</i> sp.	95	100
	M12	1	<i>Fusarium solani</i>	100	99,64
	M13	2	<i>Fusarium solani</i>	99	99,46
	M14	1	<i>Monocillium tenue</i>	100	99,65
6	M17	1	<i>Epicoccum nigrum</i>	99	100
	M18	1	<i>Coniothyrium carteri</i> (<i>Querciphoma carteri</i>)	100	99,82
7	M20	1	<i>Fusarium solani</i>	100	99,46
	M21	1	<i>Fusarium solani</i>	100	99,64
	M22	1	<i>Fusarium solani</i>	99	99,46
	M23	2	<i>Fusarium solani</i>	99	99,47
8	M24	1	<i>Fusarium solani</i>	100	99,82
	M25	2	<i>Paraconiothyrium brasiliense</i>	100	99,83
9	M26	1	<i>Fusarium solani</i>	99	99,46
	M27	1	<i>Fusarium solani</i>	100	99,64
	M28	1	<i>Cadophora</i> sp.	99	99,81
10	M29	1	<i>Fusarium solani</i>	100	99,64
	M30	4	<i>Fusarium solani</i>	100	99,64

Istraživanje je obuhvatilo 10 uzoraka biljnog tkiva, od kojih su dobivena 42 micelija. Različiti morfotipovi micelija podvrgnuti su DNK analizi te je utvrđeno 10 različitih taksona s podudarnošću sekvenci od 99,46 – 100 %.

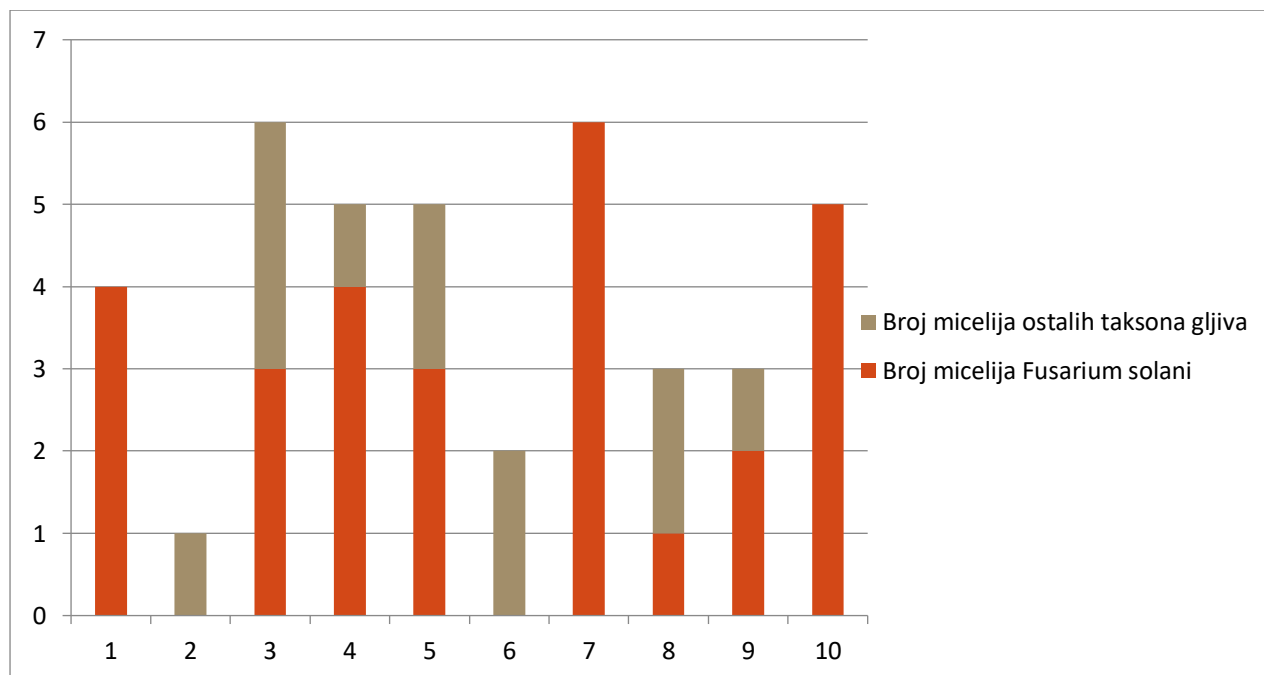
Molekularnim analizama radi utvrđivanja vrste i roda podvrgnuto je ukupno 30 izolata, od čega je 20 identificirano do razine vrste, četiri do razine roda, a za šest micelija su sekvenciranjem dobiveni neupotrebljivi kromatogrami zbog čega su ostali u potpunosti neidentificirani.

Takson *Fusarium solani* pojavljuje se na 8 od 10 uzorkovanih stabala. Od ukupno 42 istraživana micelija, 27 micelij identificiran je kao vrsta *Fusarium solani*, što ju čini najučestalijom vrstom ovog istraživanja (Graf 1).

Jedina stabla na kojima se ne pojavljuje vrsta *Fusarium solani* su stablo broj 6, čiji je jedan micelij identificiran kao *Epicoccum nigrum*, a drugi kao *Coniothyrium carteri*, te stablo broj 2, čiji su miceliji identificirani samo do razine roda *Fusarium*.

Stabla broj 1, 7 i 10 su ona na kojima se vrsta *Fusarium solani* pojavljuje sama, dok se na stablima 3, 4, 5, 8 i 9 pojavljuje s drugim vrstama.

Na stablu broj 5 su uz najučestaliju vrstu, *Fusarium solani*, pronađena još 2 druga taksona, *Periconia* sp. i *Monocillium tenue*, što ga čini stablom s najvećim brojem pronađenih taksona (3).



Graf 1. Prikaz odnosa broja izoliranih micelija *Fusarium solani* i ostalih taksona gljiva po pojedinom stablu

5. RASPRAVA

5.1. Uloga gljive *Fusarium solani* u odumiranju stabala u KSP

Petkovac

Rodu *Fusarium* pripada puno vrsta koje se smatraju najvažnijim patogenim gljivama tla. One pridolaze na različitim vrstama biljaka na kojima uzrokuju polijeganje ponika i patogeni su šumskog sjemena. Gljive su koje se najčešće pronalaze na sjemenu i plodovima šumskog drveća (Glavaš, 1999). Karakteristične su po tome što stvaraju makrokonidije, mikrokonidije i hlamidospore. Nakon što zaraze sjeme prelaze na klice i mlade biljke i uzrokuju njihovo polijeganje. Pavlinov i dr. (1979) zaključuju da se te gljive nakupljaju u tlu sastojina četinjača, oboljelom sjemenu i sadnicama te mogu uzrokovati velike gubitke u šumskim rasadnicima i staklenicima. Razvoju vrsta iz roda *Fusarium* pogoduje visoka vlaga i temperatura tla te alkalno i neutralno tlo. Visoka vlaga i temperatura mogu se stvoriti u staklenicima, ali također se mogu pronaći povoljni uvjeti za razvoj gljiva i u šumskim rasadnicima. Bolest je vrlo česta u teškim i zbijenim tlima, što je potvrđeno i ovim istraživanjem lužnjakove plantaže gdje je tlo zbijeno od česte uporabe mehanizacije. Vrste iz roda *Fusarium* pronađene u tlu mogu se biološki kontrolirati drugim mikroorganizmima, a kao antagonisti spominju se gljive iz roda *Trichoderma* (Glavaš, 1999).

Važne karakteristike gljiva iz roda *Fusarium*:

- Česte na vrstama narušenog zdravstvenog stanja
- Rasprostranjene osobito u šumskim rasadnicima
- Fakultativni paraziti
- Dolaze na teškim i zbijenim tlima.

Klonska sjemenska plantaža Petkovac osnovana je na poljoprivrednoj površini koja je prije sadnje rameta bila mehanički obrađena. Unatoč tome, tlo je vrlo teško i zbijeno, prilikom uzimanja uzoraka na terenu nije bilo moguće uzimanje uzoraka tla zbog zbijenosti. Mogući uzrok širenja ove patogene vrste u KSP Petkovac je upravo poljoprivredno tlo koje stvara povoljne uvjete za razvoj ove vrste gljive. Prethodno je spomenuto da se vrsta *Fusarium solani* češće pojavljuje na stablima smanjenje vitalnosti, a budući da su stabla u plantaži napadnuta od štetnika *Corythucha*

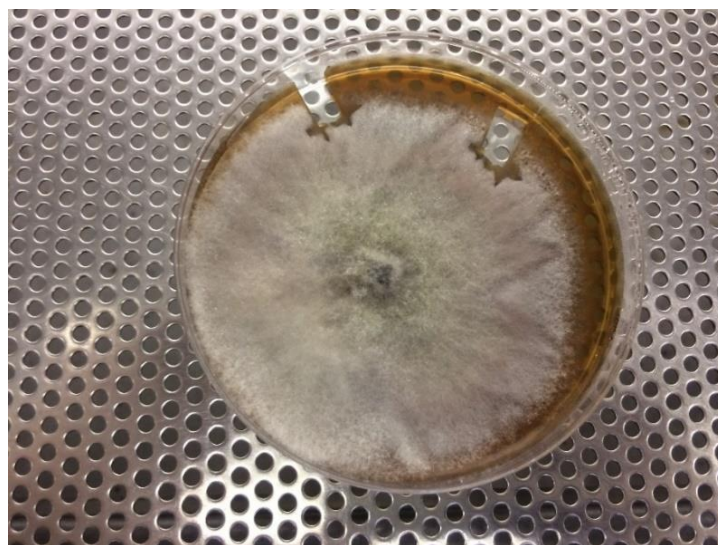
arcuata, moguće je da *Fusarium solani* dolazi kao sekundarni čimbenik narušavanja zdravstvenog stanja hrastovih stabala.

Na PDA podlozi *Fusarium solani* proizvodi uglavnom micelij bijele boje koji se relativno brzo širi po hranjivoj podlozi. Svi dobiveni miceliji ove vrste u ovom laboratorijskom istraživanju bili su blijedožute do bijele boje, paučaste strukture (Slika 20).

U literaturi se gljiva *Fusarium solani* navodi kao patogen poljoprivrednih kultura (Coleman, 2016), ali i kao truležnica koja se pojavljuje na korijenu (Summerell, i Leslie, 2011). Uzrokuje rak debla više vrsta drveća, gdje dolazi kao parazit rana i slabosti (Demirci i Maden, 2006). Poznato je također da izaziva odumiranje biljaka u ekonomski važnim kulturama: krumpira, graška, paprike, orhideje, avokada, tikvica (Leslie, 2006).

U Hrvatskoj je pronađena na topolama (*Populus* spp.), u nekrotičnom staničju kore grana gdje je uzrokovala odumiranje pojedinih grana odraslih stabala topole, posljedično i odumiranje dijelova krošnje. Budući da se na jasenu (*Fraxinus* spp.) relativno češće javlja na biljnim tkivima stabala narušenog zdravstvenog stanja postoji mogućnost njezina djelovanja kao slabog parazita na stablima narušenog vitaliteta (Diminić, 2005). U Hrvatskoj do sada veće štete na hrastu lužnjaku nisu zabilježene.

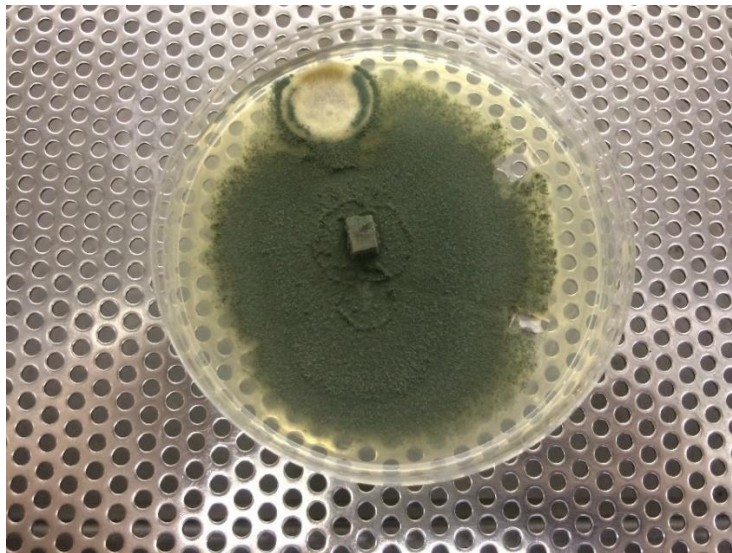
Fusarium solani proizvodi nespodne spore, mikro- i makrokonidije. Proizvodi hlamidospore i prezimljiva kao micelij ili u obliku spora u zaraženom tkivu ili sjemenu. Spore se mogu širiti zrakom, vodom ili zaraženim priborom. Gljiva može preživjeti u tlu i po nekoliko godina (Luginbuhl, 2010).



Slika 20. Miceliji vrste *Fusarium solani* na PDA hranjivoj podlozi

5.2. Uloga ostalih vrsta gljiva pronađenih na stablima KSP Petkovac

Penicillium sp. (Slika 21) su najrasprostranjenije gljive u prirodi. Mogu se pronaći na svim biljnim vrstama, na njihovim dijelovima koji odumiru, ali i na živom tkivu koje je bilo izloženo mehaničkim ozljedama. U tlima se mogu zapaziti razne vrste iz roda *Penicillium*, koje su uglavnom saprotrofi. Vrste roda *Penicillium* djeluju tako da napadaju sjeme u šumi i u skladištima i uzrokuju snižavanje sadržaja vode (Glavaš, 1999). U ovom je istraživanju zabilježen takson *Penicillium* sp. nađen na samo jednom stablu i zastupljen sa samo jednim izolatom te se može zaključiti kako ima isključivo sekundarnu ulogu u narušavanju vitaliteta stabala hrasta lužnjaka.



Slika 21. Micelij *Penicillium* sp. na PDA hranjivoj podlozi

Bjerkandera adusta (Slika 22) primarno napada listače, iako se može pojaviti i na četinjačama. Na biljkama domaćinima uzrokuje bijelu trulež. To je spororastuća parazitska vrsta, pri napadu uzrokuje sporo odumiranje biljke i nastavlja se razvijati kao saprotrof. Pojavljuje se na šumskom drveću, ali i u rasadnicima i vrtovima. Poprilično je rasprostranjena u Europi, Americi i Aziji (Domanski, 1982). Iako su tri micelija ove vrste izolirana iz stabala hrasta lužnjaka u ovom istraživanju, nije bilo vidljivih simptoma ove vrste, stoga se može zaključiti da nije imala presudnu ulogu u smanjenju vitalnosti stabala hrasta, već je nastupila sekundarno na stablima već narušenog zdravstvenog stanja.

Prema radu Jelića i Tortića (1973) na području Posavine i šumskog kompleksa Prašnik u čijoj vegetaciji prevladava hrast lužnjak zapažena je vrsta *B. adusta*.



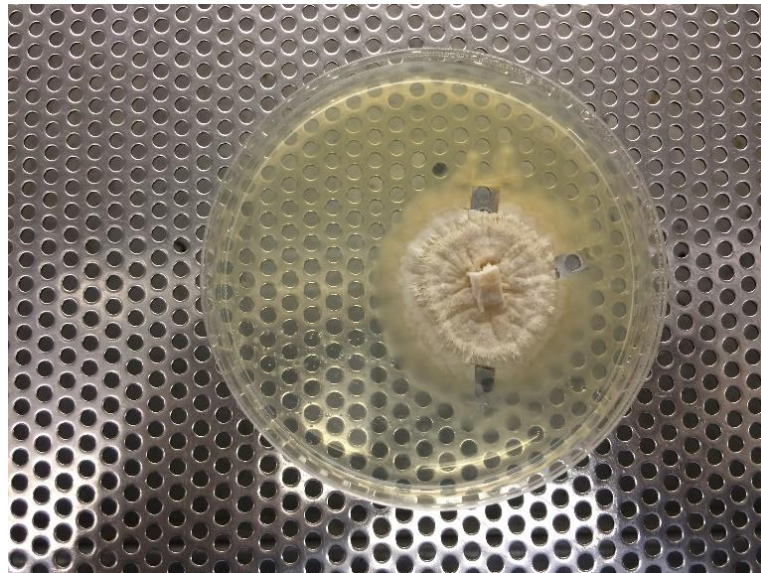
Slika 22. Micelij vrste *Bjerkandera adusta* na PDA hranjivoj podlozi

Većina vrsta roda ***Periconia*** (Slika 23) su saprotrofi i endofiti koji se nastanjuju na zeljastim i drvenastim biljkama na različitim geografskim područjima i staništima, a nekolicina vrsta je važno jer su patogene gljive koje uzrokuju različite bolesti korijena i lišća (Markovskaja 2013). Kao i većina taksona koji su dobiveni u ovom istraživanju i ovaj rod pripada saprotrofima koji dolaze uglavnom na korijenju napadnutih biljaka. Možemo zaključiti da njihov utjecaj na istraživanim stablima ipak nije bio od presudne važnosti jer se ovaj takson nije često pojavljivao u ovome istraživanju, samo je jedan micelij identificiran kao ovaj rod.



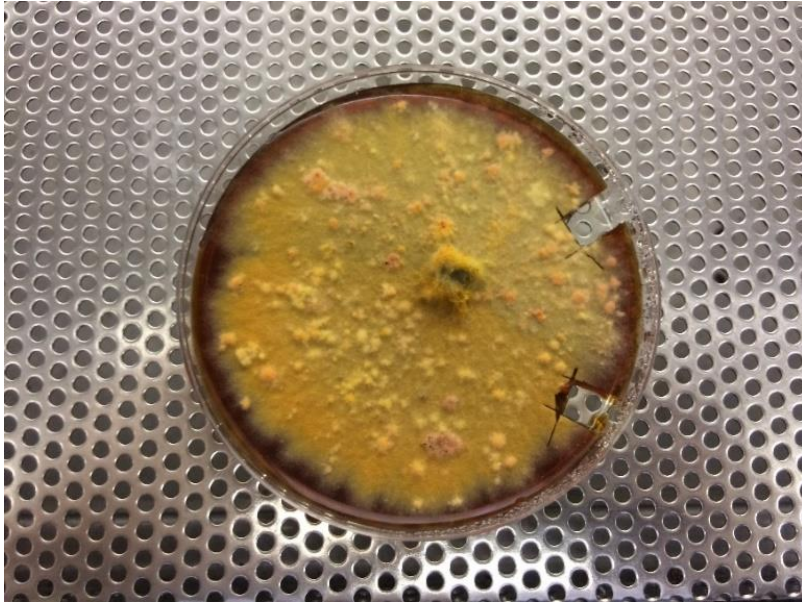
Slika 23. Micelij *Periconia* sp. na PDA hranjivoj podlozi

Vrste roda ***Monocillium*** (Slika 24) uglavnom nastanjuju propadajuće biljne dijelove, poput otpalog lišća i kore raznih crnogoričnih vrsta. Određen broj vrsta može se pojaviti kao parazit lišajeva i plodnih tijela drugih gljiva (Gams i suradnici, 2019). Samo jedan micelij u ovom istraživanju (morfotip 14) identificiran je kao ***Monocillium tenue***.



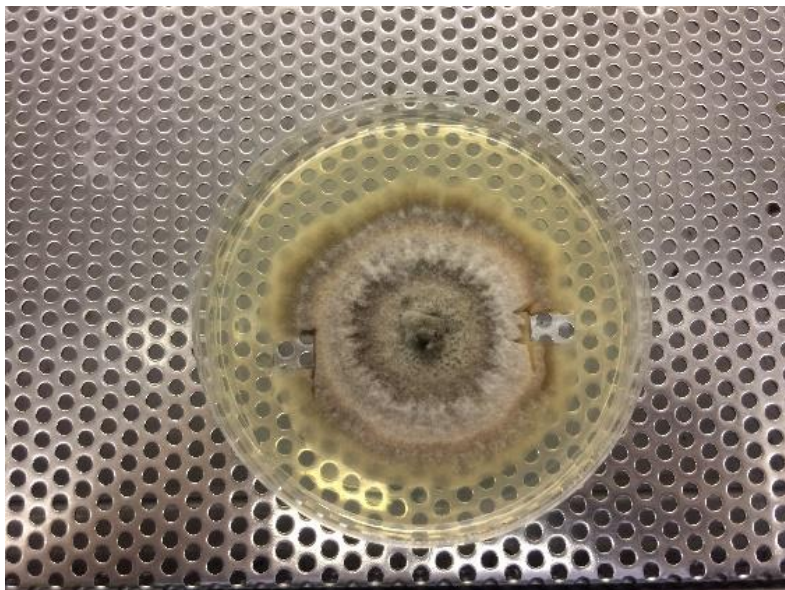
Slika 24. Micelij vrste *Monocillium tenue* na PDA hranjivoj podlozi

Epicoccum nigrum (Slika 25) je gotovo globalno rasprostranjena, javlja se u Americi, Aziji i Europi. Spore ove vrste razvijaju se u raznim uvjetima i staništima, pretežito u tlu i pijesku. To je saprotrofna gljiva koja tvori pustule, sastavljene od sporodohija i konidija, na mrtvim i umirućim biljkama. Uglavnom se javlja na žitaricama, ali pronađena je i na šumskim vrstama (Andersen, 1981). Tolerantna je na promjene raspoloživosti vode, ustanovljeno je da se rast hifa nastavlja unutar jednog sata od izlaganja vodi (Cole, 1981). *Epicoccum nigrum* također spada u skupinu gljiva koje dolaze u tlu kao saprotrofi. Budući da je identificirana samo za jedan micelij morfotipa 17 možemo zaključiti da nije zaslužna za smanjenje vitalnosti stabala u ovoj sastojini te dolazi zajedno s drugim, važnijim vrstama.



Slika 25. Micelij vrste *Epicoccum nigrum* na PDA hranjivoj podlozi

***Coniothyrium carteri* (*Querciphoma carteri*)** je endofit na boru (Quadri i sur., 2014). Ove su gljive uobičajeni stanovnici tla i drveta i hiperparaziti su na drugim gljivama (Damm i sur., 2008). Vrsta *Coniothyrium carteri* (Slika 26) identificirana je samo za jedan micelij, morfotip 18. Može se pretpostaviti da ova vrsta nije imala bitnu ulogu u smanjenju vitaliteta stabala hrasta, moguće je da se pojavljuje samo kao hiperparazit na nekoj drugoj gljivi.



Slika 26. Micelij vrste *Coniothyrium carteri* na PDA hranjivoj podlozi

Paraconiothyrium brasiliense je endofit u biljkama (Liu i sur., 2010), nađena u Africi na *Prunus* sp. (Damm i sur., 2008) i u Brazilu na plodu kave (Verkley i sur., 2004), te u lišću *Picea glauca* u Kanadi. Simptomi ove gljive (Slika 27) su nekrotične lezije na živim stablima (Damm i sur., 2008). U ovom istraživanju su svega dva micelija identificirana kao ova vrsta, stoga se može pretpostaviti da nije imala važnu ulogu u narušavanju vitaliteta stabala u plantaži.



Slika 27. Micelij vrste *Paraconiothyrium brasiliense* na PDA hranjivoj podlozi

Većina vrsta roda ***Cadophora*** (Slika 28) primarno su izolirane iz tla i biljaka, saprotrofi su, djeluju kao biljni patogeni i mogu kolonizirati korijenje. Na primjer, patogeni uzročnik *Cadophora gregata* uzrokuje propadanje stabljike soje (smeđe obojenje), dok *Cadophora malorum* uzrokuje raspad drveta kivija. Također, vrste roda *Cadophora* izolirane su iz tla i raspadnutih stabala u ekstremnim uvjetima okoliša kao što su na Antarktici (Travadon i sur., 2014). Gljive roda *Cadophora* pronađene su diljem svijeta i odgovorne su za mali broj poljoprivrednih bolesti kao što su lezije na vinovoj lozi ili nekroze na kiviju (Rusman i sur., 2015). Ovaj rod, kao i većina utvrđenih u ovom istraživanju, pripada saprotrofima koji dolaze u tlu. U ovom istraživanju utvrđeno je da samo jedan micelij pripada ovom rodu, morfotip 28. Budući da je vrlo malo zastupljen vjerojatno nije imao presudnu ulogu u smanjenju vitaliteta stabala hrasta lužnjaka.



Slika 28. Micelij *Cadophora* sp. na PDA hranjivoj podlozi

6. ZAKLJUČAK

Cilj analize simptomatičnog tkiva hrasta lužnjaka u klonskoj sjemenskoj plantaži Petkovac bio je dobiti taksone gljiva prisutne u teklinama na deblu i utvrditi njihovu ulogu u smanjenju vitaliteta stabala te ispitati jesu li dobiveni taksoni primarni ili sekundarni čimbenici koji utječu na deformaciju stabala, slabo plodonošenje, sušenje i/ili odumiranje stabala.

Na analiziranim uzorcima identificirano je 27 micelija gljive *Fusarium solani*, od ukupno 42 micelija podvrgnutih molekularnoj analizi, dok je pojava ostalih taksona vrlo rijetka u usporedbi s dominantnom vrstom *Fusarium solani*.

Budući da je vrsta *Fusarium solani* poznata kao parazit koji češće dolazi na stablima narušenog zdravstvenog stanja, može se zaključiti da ova vrsta ni u ovoj sastojini nije bila primarni parazit, već sekundarni, čiji se utjecaj ne može zanemariti te također pridonosi slabljenju i sušenju hrasta lužnjaka. Jedan od mogućih abiotičkih uzročnika oslabljene vitalnosti je zbijeno i teško tlo koje je primijećeno u istraživanoj sastojini. Budući da je sastojina podignuta na poljoprivrednom zemljištu, postoji mogućnost zadržavanja i opstanka vrste *Fusarium solani* u tlu jer je poznata po tome što parazitira kako na šumskim, tako i na poljoprivrednim vrstama.

Jedno od mogućih rješenja poboljšanja vitalnosti stabala hrasta lužnjaka u klonskoj sjemenskoj plantaži Petkovac mogli bi biti rahljenje i dodavanje hranjivih tvari u tlo.

Moguće je da je jedan od većih biotskih uzročnika sušenja stabala u sastojini invanzivna vrsta hrastova mrežasta stjenica koja uzrokuje žućenje, sušenje i prerano otpadanje lišća, što je bilo vidljivo na ispitivanim stablima hrasta lužnjaka.

Budući da su klonske sjemenske plantaže hrasta lužnjaka ekonomski i ekološki vrlo značajne potrebno je pravovremeno provoditi preventivne mjere zaštite kako bi se spriječilo njihovo prerano odumiranje. Vrlo je bitno koristiti odgovarajuću mehanizaciju, sanirati nastale ozljede, pravilno orezivati krošnju u ne prečestim vremenskim razmacima, dohranjivati tlo, te u slučaju pojave štetnog djelovanja gljiva koristiti odgovarajuće fungicide.

Hrast lužnjak je jedna od najznačajnijih šumskih vrsta na području Slavonije, stoga je važno očuvanje njegovih prirodnih staništa, kao i očuvanje i osnivanje njegovih reproduksijskih sastojina.

7. LITERATURA

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, br. 215(3), str. 403-410.

Anderson, K.H., Domsch, W. Gams, Traute-Heidi., 1981.: Compendium of soil fungi, Academic Press, London

Bakys, R., Vasaitis, R., Barklund, P., Ihrmark, K., & Stenlid, J., 2009.: Investigations concerning the role of *Chalara fraxinea* in declining *Fraxinus excelsior*, *Plant Pathology*, br. 58, str. 284-292.

Brasier, Kirk, (2001), Comparative aggressiveness of standard and variant hybrid alder phytophthoras, *Phytophthora cambivora* and other *Phytophthora* species on bark of *Alnus*, *Quercus* and other woody hosts. *Plant Pathology* 50, str. 218-229

Brasier, C., Jung, T., (2009), Recent developments in *Phytophthora* diseases of trees and natural ecosystems in Europe, UK, str. 1-12

Cole, Garry, Kendrick, Bryce, 1981.: Biology of conidial fungi. Acad. Press., New York

Coleman JJ. (2016), The *Fusarium solani* species complex: ubiquitous pathogens of agricultural importance. *Molecular plant pathology*, 17(2), str. 146-58

Damm, U., Verkley, G.J.M., Crous P.W., Fourie P.H., Haegi A., Riccioni L. (2008), Novel *Paraconiothyrium* species on stone fruit trees and other woody hosts. 20, str. 9-17

Domanski, S., *Bjerkandera adusta* on young *Quercus rubra* and *Quercus robur* injured by late spring frosts in the Upper Silesia Industrial District of Poland, Wiley J. and Sons, *Forest Pathology* (1982), str. 406-413

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

Gams., W., Gräfenhan, S., Schroers J. (2019) Ascomycete genus *Niesslia* and associated monocillium-like anamorphs. *Mycological Progress*, 18(1) str. 1-72

Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2(2), 113-118.

Glavaš, M., 1999.: *Gljivične bolesti šumskoga drveća*, Šumarski fakultet, Zagreb

Gradečki - Poštenjak M., Novak Agbaba S., Čelepirović N., Posarić D. (2018), Kvalitativne osobine žira lužnjaka (*Quercus robur* L.) iz spačvanskog bazena i posljedice njegovog neodgovarajućeg skladištenja, (Hrvat. Šumar. inst.) 46 (1) str. 1–13

Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT., Nucleic Acids Symposium Series, br. 41, str. 95-98.

Hrašovec, B., Posarić, D., Lukić, I., Pernek, M., (2013). *Prvi nalaz hrastove mrežaste stjenice (Corythucha arcuata) u Hrvatskoj*, Šumarski list br. (9-10), str. 499-503

Jelić, M., Tortić M., Neke osobitosti flore makroskopskih gljiva u šumi lužnjaka u rezervatu Prašnik, Acta Bot. Croat. 32 (1973), str. 227-235

Ježić, M., Krstin, L., Rigling, d., & Ćurković-Perica, M. (2012). High diversity in populations of the introduced plant pathogen, *Cryphonectria parasitica*, due to encounters between genetically divergent genotypes. *Molecular Ecology*, br. 21(1), str. 87-99

Kajba, D., Bogdan, S. (2019) Varijabilnost klonova u proizvodnji žira i njezin učinak na efektivne veličine populacija i genetsku raznolikost potomstva u klonskim sjemenskim plantažama hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.) u Hrvatskoj, Šumarski list br. (3-4), str. 111-123

Klepac, D., Dundović J., Gračan J., 1996.: *Hrast lužnjak (Quercus robur L.) u Hrvatskoj*, Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti, Vinkovci- Zagreb

Kranjec, J., Milotić, M., Hegol, M., & Diminić, D. (2017). Gljivama slični organizmi u tlu odumirućih sastojina poljskog jasena (*Fraxinus angustifolia* Vahl), Šumarski list br. (3-4), str. 115-122.

Kranjec, J., Uloga gljiva i gljivama sličnih organizama u odumiranju posavskog jasena (*Fraxinus angustifolia* Vahl) u posavskim nizinskim šumama u Republici Hrvatskoj, doktorski rad, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2017.

Leslie, J. F., Summerell, Brett A., (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*, Blackwell, str. 250-254

Liu, L., Gao, H., Chen, X., Cai, X., Yang, L., Guo, L., Yao, X., Che, Y. , (2010), Brasilamides A–D: Sesquiterpenoids from the Plant Endophytic Fungus *Paraconiothyrium brasiliense*, *Journal of Natural Products*, str. 3302-3306

Littvay, T., Značaj klonskih sjemenskih plantaža (KSP) i nove tehnologije očuvanja kvalitete šumskog sjemena, za budućnost Hrvatskog šumarstva, Teme za predavanja u okviru HKIŠDT za 2017. godinu

Luginbuhl S., (2010), *Fusarium solani*, A class project for PP728 Soilborne Plant Pathogens, New York

Markovskaja, S., Audrius, K., "Morphological and molecular characterisation of *Periconia pseudobyssoides* sp. nov. and closely related *P. byssoides*." *Mycological Progress* 13 (2013), str. 291-302.

Pernek, M., Županić, M., Diminić, D., Cech, T. (2011). *Vrste roda Phytophthora na*

bukvi i topolama u Hrvatskoj, Šumarski list, posebni broj, str. 130-137

Qadri, M., Rajput, R., Abdin, MZ., Vishwakarma, RA., Riyaz-Ul-Hassan, S. (2014), Diversity, Molecular Phylogeny, and Bioactive Potential of Fungal Endophytes Associated with the Himalayan Blue Pine (*Pinus wallichiana*), 67(4), str. 877- 887

Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., . . . Crous, P. W. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi., Proceedings of the National Academy of Sciences, br. 109(16), str. 6241-6246.

Šimunić, M., Nemeš, T. *Klonska sjemenska plantaža hrasta lužnjaka (Quercus robur L.) "Petkovac"*, Zagreb, 2009., str. 73-74

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White (Eds.), PCR protocols: A Guide to Methods and Applications (pp. 315-322). New York, USA: Academic Press Inc.