

Izolacija micelija patogene gljive *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M.E. Barr iz kore pitomog kestena (*Castanea sativa* (Mill.))

Frljak, Dominik

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:108:592090>

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](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET ŠUMARSTVA I DRVNE TEHNOLOGIJE
ŠUMARSKI ODSJEK

PREDDIPLOMSKI STUDIJ
ŠUMARSTVO

DOMINIK FRLJAK

IZOLACIJA MICELIJA PATOGENE GLJIVE *CRYPHONECTRIA PARASITICA*
(MURRILL) M.E. BARR IZ KORE PITOMOG KESTENA (*CASTANEA SATIVA*
(MILL.))

ZAVRŠNI RAD

ZAGREB (RUJAN, 2022.)



IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

OB FŠDT 05 07

Revizija: 2

Datum: 29.04.2021.

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

U Zagrebu, 28.9.2022. godine

vlastoručni potpis

Dominik Frljak

PODACI O ZAVRŠNOM RADU

Zavod:	Zavod za zaštitu šuma i lovno gospodarenje
Predmet:	Šumarska fitopatologija
Mentor:	Prof. dr. sc. Danko Diminić
Komentor:	Prof.dr.sc. Jelen Kranjec-Orlović
Student:	Dominik Frljak
JMBAG	0068228832
Akad. Godina:	2021/2022
Mjesto, datum obrane:	Zagreb, 28.9.2022
Sadržaj rada:	Broj stranica : 23 Slika: 29 Tablica : 0 Navoda literature : 4
Sažetak:	Ovaj rad obuhvaća uspoređivanje čiste kulture micelija gljive <i>Cryphonectria parasitica</i> na dvije različite metode istraživanja i dvije različite hranjive podloge. Ovo istraživanje je pohranjeno na dugoročnu pohranu koja može poslužiti za daljnja istraživanja i uspoređivanja gljive.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 Biologija raka kore pitomog kestena.....	1
1.2 Štetnost <i>C. parastica</i>	2
1.3. Cilj istraživanja	2
2. MATERIJALI I METODE	3
2.1. Podrijetlo uzoraka	3
2.2. Izolacija micelija gljive.....	3
2.3. Dugoročna pohrana micelija	13
3. REZULTATI	15
3.1. Miceliji na PDA :	16
3.2. Miceliji na MEA :	19
4. RASPRAVA	22
5. ZAKLJUČAK	23
6. LITERATURA	24

1.UVOD

Zadnjih nekoliko desetljeća pitomi kesten je postao znatno ugrožena vrsta koja stradava od raka kestenove kore , pod nazivom *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M.E. Barr. Rak kore pitomog kestena uzrokuje intenzivno sušenje i propadanje stabala. *Cryphonectrica parasitica* je prvi put zabilježena u Europi 1938. godine u Italiji, a kod nas se prvi put pojavljuje 1995. godine na lovranskom području u blizini Opatije. Od tamo se vrlo brzo proširila na cjelokupno područje pitomog kestena u Hrvatskoj što je opisao Halambek 1998. Godine.

Sušenje pitomog kestena je u stalnom blagom porastu. *C. parasitica*, nije jedini, ali je navažniji uzročnik sušenja i propadanja pitomog kestena.

Tijekom ljeta 2005.godine provedeno je istraživanje na raku kore pitomog kestena (Diminić, Berta). U tom istraživanju je utvrđeno 19% zdravih stabala, s aktivnim rakom od 5% , s aktivnim i kalusirajućim rakom 8.4%, te stabala s aktivnim rakom i nekrozom 3%. Sva tri tipa raka nađeno je na 1% stabala. Najviše je bilo stabala sa površinskom nekrozom i kalusirajućim rakom što iznosi 63.6 % od ukupnog broja stabala. Tim istraživanjem pokazalo se na prisutnost hipovirulentnog soja ove gljive, što znači da će se smanjiti zaraza agresivnim patotipom prema zaključku istraživanja.

1.1 Biologija raka kore pitomog kestena

Spolne spore kod *Cryphonectria parasitica* nazivamo askosporama zbog toga što se nalaze unutar askusa. Askusi su kod raka pitomog kestena dugački 30 - 60 μm i široki 7-9 μm . One se mogu širiti pomoću vjetra do 40 kilometara, ali samo za vrijeme kišnog razdoblja. Osim spolnog načina, još se razmnožava i nespolnim putem. Kod nespolnog načina imamo konidiospore koje se razvijaju u konidioforima. Konidiospore se također oslobađaju u kišno razdoblje, te se šire vjetrom. Osim vjetra *Cryphonectrica parasitica* se širi pomoću kukaca i čovjeka. Nakon oslobađenja spora gljiva treba imati povoljne uvjete za razvoj, a to bi značilo da na stablu mora postojati rana, pošto patogen ulazi u stablo pomoću otvorene rane, kao što su oštećenja na drvetu, nakon tog infektivne spore kliju i zaražuju novog domaćina (Halambek 1988; Guerin i sur. 2001).

Azijske vrste kestena su zbog duge koevolucije s gljivom postale tolerantne na nju, te nemaju štetne posljedice za razliku od novije zaraženih europskih i američkih vrsta, koje se nisu

prilagodile na rak kore pitomog kestena, te zbog toga imaju velika oštećenja i dolazi do odumiranja pitomog kestena.

1.2 Štetnost *C. parastica*

Ona je patogena gljiva koja može zaraziti samo dijelove biljke koji se nalaze iznad zemlje, a to su stabljike, grane i grančice. Mlađa stabla su jače osjetljivija na infekciju, te se kod njih simptomi mogu uočiti već unutar mjesec dana nakon infekcije, uslijed čega u nekoliko mjeseci odumiru grančice (Heiniger i Rigling 1994). Kod ove gljive najuočljiviji simptomi su promjene na kori na mjestu infekcije. Na mlađim stablima dolazi do promjene boje na kori u crvenkastosmeđu boju, te se stvara uleknuće. Dok se na starim stablima teže raspoznaju simptomi, oni se mogu tek prepoznati kad dođe do uzdužnog raspucavanja kore. Gljiva razvija blijedo smeđi micelij koji je jasan pokazatelj zaraze rakom pitomog kestena. Lišće na zaraženim dijelovima postaje žuto ili smeđe i ostaje visjeti kao „zastava“ (Rigling i Prospero, 2017), te je to jedan od pokazatelja bolesti, osobito tokom zime jer lišće ne otpadne. Gljiva može uzrokovati nekroze na izbojcima, panju, deblu i granama, kod raka kore pitomog kestena razlikujemo tri vrste raka, a to su: aktivni, površinski te kalusirajući. Kod aktivnog tipa javljaju se uzdužne pukotine, otvorene rane te žutosmeđi izbojci ispod mjesta infekcije, te je on najštetniji oblik za stablo. On je uzrokovan virulentim sojem gljive. Površinski tip uzrokuje hrapavost kore i zadebljanje na mjestu infekcije, a kalusirajući tip je karakterističan po kalusnom staničju oko rane, što pokazuje da se stablo bori protiv gljive stvarajući kalus da spriječi daljnje širenje gljive.

1.3. Cilj istraživanja

C. parasitica zadnjih nekoliko desetljeća uništava šume pitomog kestena. Zbog velike štetnosti tog patogena napravili smo pokus sa čistim kulturama micelija gljive *C. parasitica* na dvije različite podloge. Prva podloga je PDA (Potato dextrose agar), dok je druga podloga MEA (Malt extract agar). Kroz ovo istraživanje dobiveni su miceliji patogena koji su važni za dugoročnu pohranu i moguća buduća istraživanja, te za usporedbu s micelijima patogena s drugih područja. S ovim istraživanjem dolazimo do upoznavanja rasta gljive na različitim hranjivim podlogama, kako bi bolje razumijeli fiziologiju gljive, te kako bi pokušali smanjiti njen štetni utjecaj u sastojinama pitomog kestena.

2.MATERIJALI I METODE

2.1. Podrijetlo uzoraka

Materijale za ovu analizu skupili smo na mjestu Dotrščina, na nastavnom pokusnom šumarskog objektu (NPŠO) u Zagrebu, 2021 godine. To su bili uzorci grana i izbojaka sa stromama gljive sakupljenih na stablima pitomog kestena koji je bio zaražen gljivom *Cryphonectria parasitica*. Skupljeni su u travnju 2021 godine.

2.2. Izolacija micelija gljive

Prije izolacije pripravljeno je 10 velikih petrijevki, 10ak MEA i 10ak PDA Petrijevki. Pripremljena je sterilna voda, uzorci kore i grana sa plodištima *C. parasitica*.

Cilj je bio napraviti 5 Petrijevih PDA metodom i 5 Petrijevki MEA metodom.

Postupak izolacije iz komadića kore/micelija :

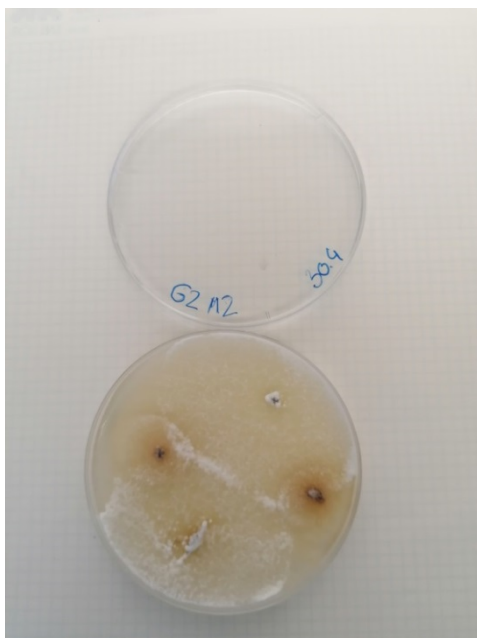
- 1) Uzeta kora, stavljena je na dasku za rezanje unutar Laminara (mikrobiološki kabinet za rad u atmosferi čistoga zraka)
- 2) Skalpelom je pažljivo rezan sloj kore i tražen je rub nekroze ili micelij gljive
- 3) Sterilnim skalpelom i pincetom izrezani dio nekroze ili micelija stavljen je na hranjivu podlogu
- 4) Uzeta nekroza je sa ruba uzorka, odnosno uhvaćen je i odumrli i zdravi dio uzorka
- 5) Uzeta su 4 uzorka/komadića kore/micelija
- 6) Ovom metodom dobiveno je ukupno 5 petrijevskih zdjelica s uzorcima/komadićima kore/micelija (Slika 1. – Slika 5.)

G1M1 – označava uzorak grane i micelija : Grana 1 , Micelij 1.

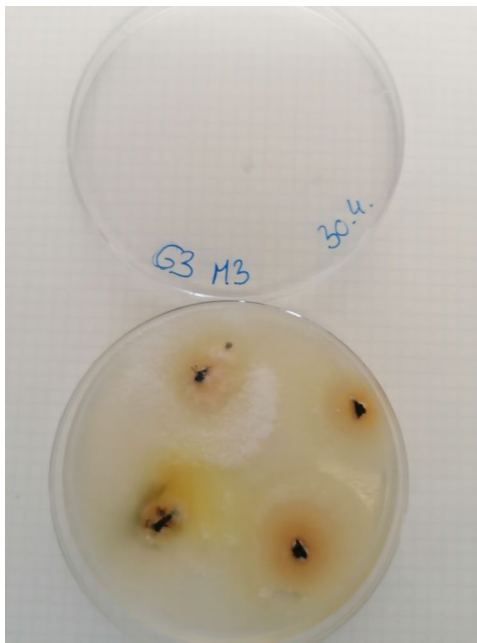
Laminarni mikrobiološki kabinet za rad u atmosferi čistog zraka je kabinet u kojem su uzorci površinski sterilizirani uranjanjem u 96%tni etanol na jednu minute te nakon toga su uronjeni u sterilnu destiliranu vodu , a zatim posušeni ručnikom. Laminarni kabinet radi na principu cirkulacije zraka te na taj način spriječava ulazak čestica.



Slika 1. G1M1



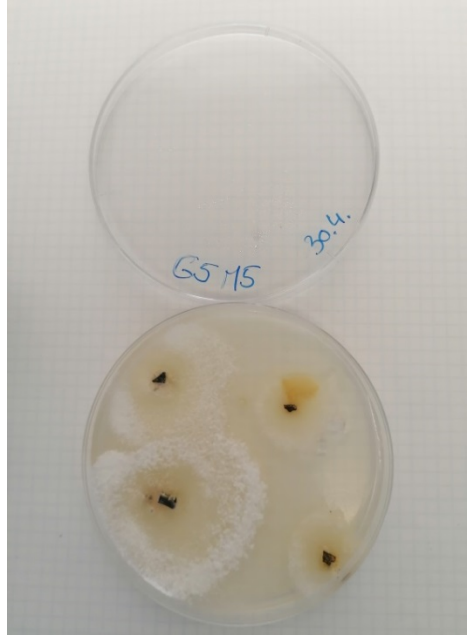
Slika 2. G2M2



Slika 3. G3M3



Slika 4. G4M4



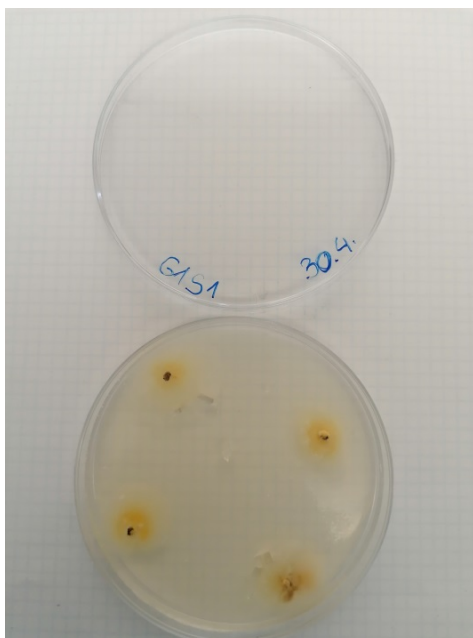
Slika 5. G5M5

Postupak izolacije iz strome/plodišta :

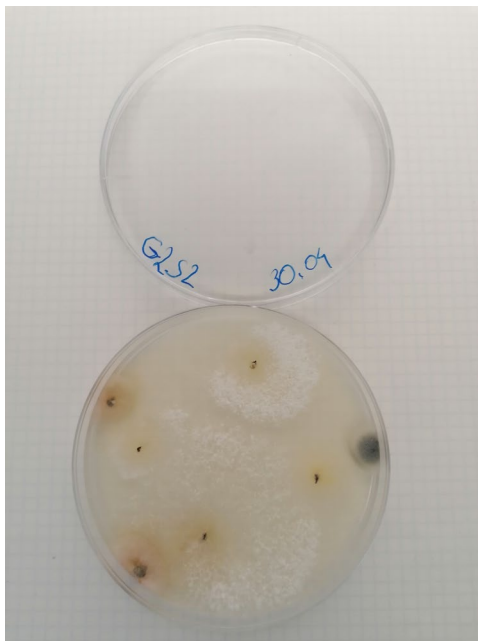
- 1) Na uzorku izbojka ili grane pronađeno je plodište rađeno izvan laminara
- 2) Plodište je izrezano pomoću sterilnog skalpela i pincetom
- 3) Plodište je stavljeno na hranjivu podlogu te je odmah poklopljeno u Petrijevoj zdjelici
- 4) Po jednoj Petrijevki napravljena su 4 plodišta
- 5) Napravljeno je ukupno 5 Petrijevke zdjelice ovom metodom (Slika 6. – Slika 10.)

Kroz naredna dva tjedna, bilo je potrebno provjeravati rast micelija te prema potrebi, željene micelije, presađivati u nove Petrijeve zdjelice – zbog dobivanja čistih kultura. Pesađivanje se obavljalo u laminaru. Za presađivanje se koristio sterilni alat te male Petrijeve zdjelice (promjera 55 mm) s PDA i MEA hranjivom podlogom. Alat je steriliziran uranjanjem u 96 % etanol i kratkim izlaganjem plamenu da se dobiju što je moguće čišće kulture micelija.

G1S1 – Označava uzeti uzorak sa grane i strome : Grana 1 , Stroma 1.



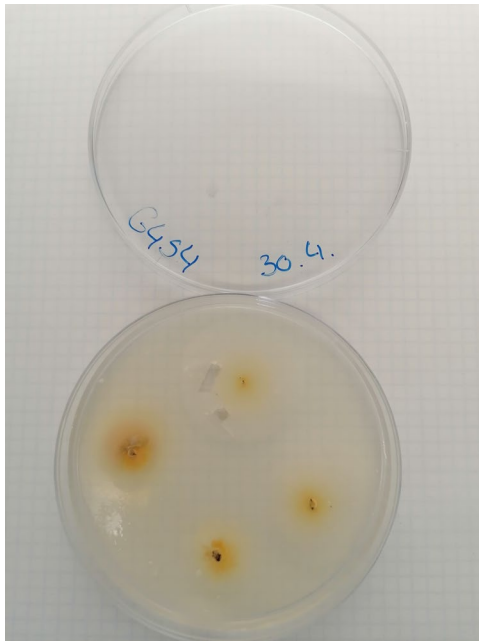
Slika 6. G1S1



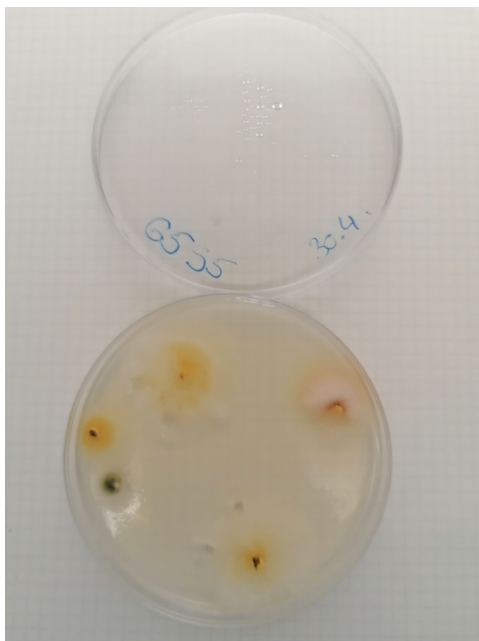
Slike 7. S2G2



Slike 8. S3G3



Sluke 9. S4G4



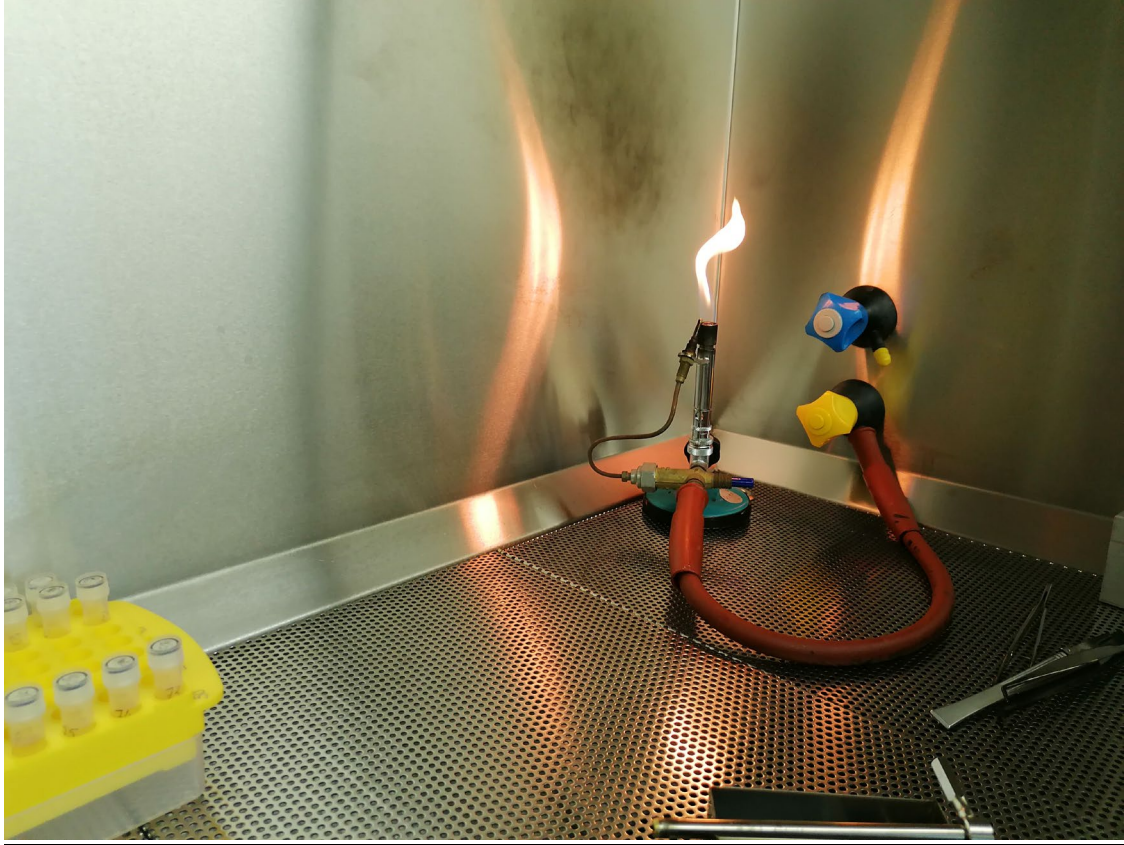
Sluke 10. S5G5



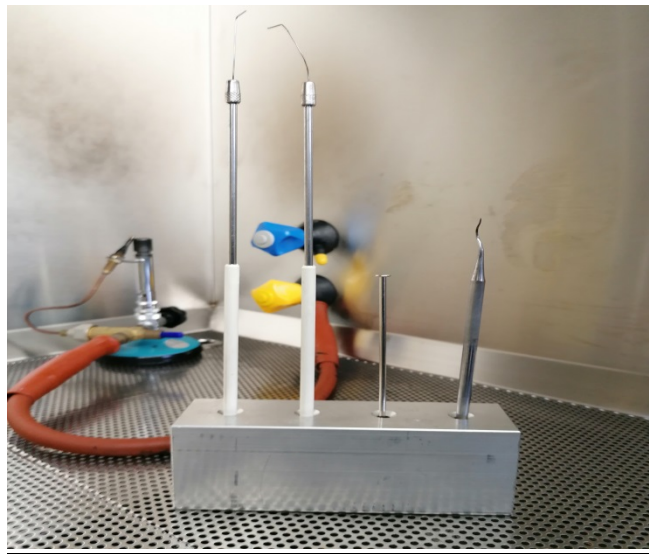
Slika 11. Laminar



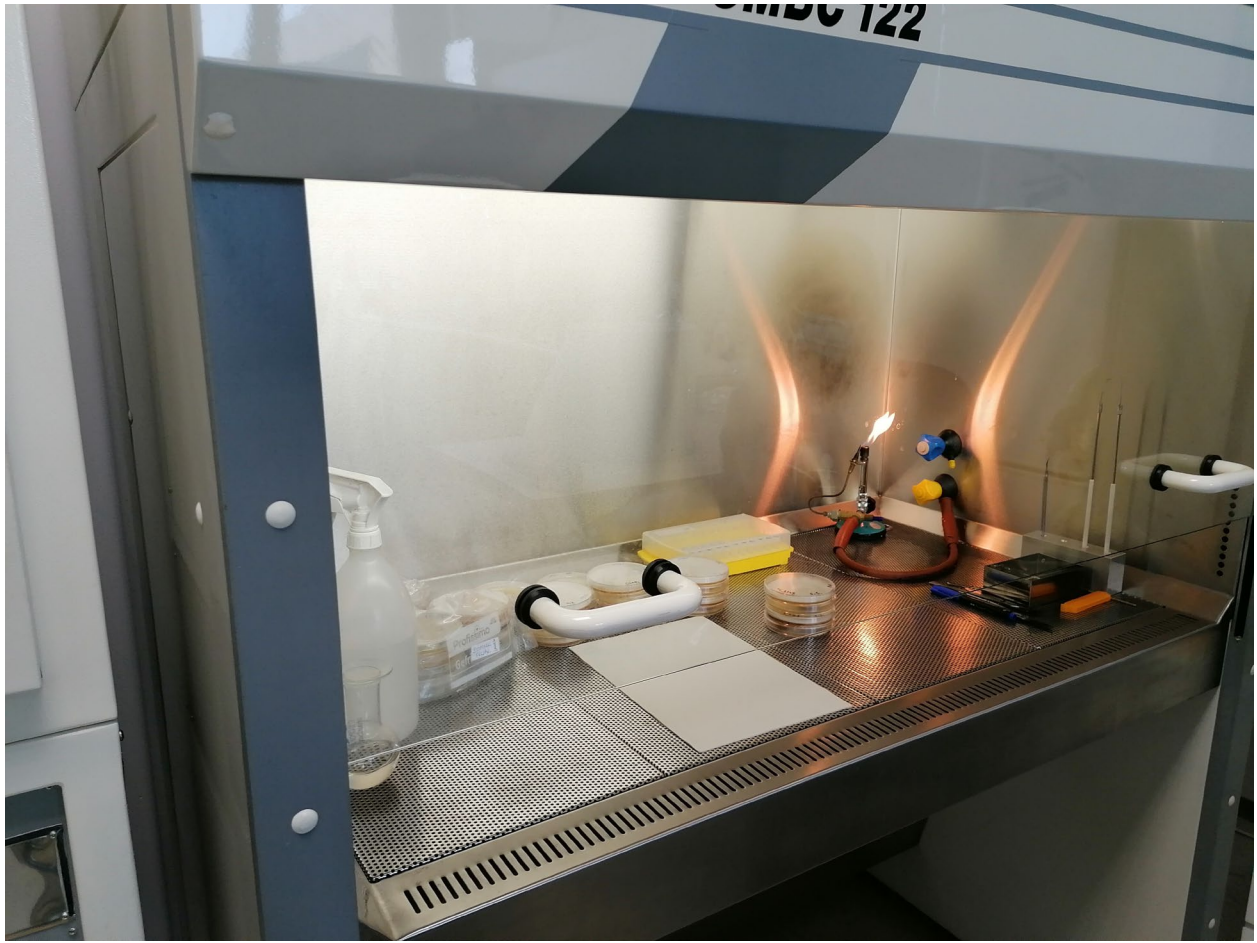
Slika 12. Sterilizirani alat



Slika 13. Plamenik za sterilizaciju alata



Slika 14. Pomoćni alat



Slika 15. Pregled unutar Laminara

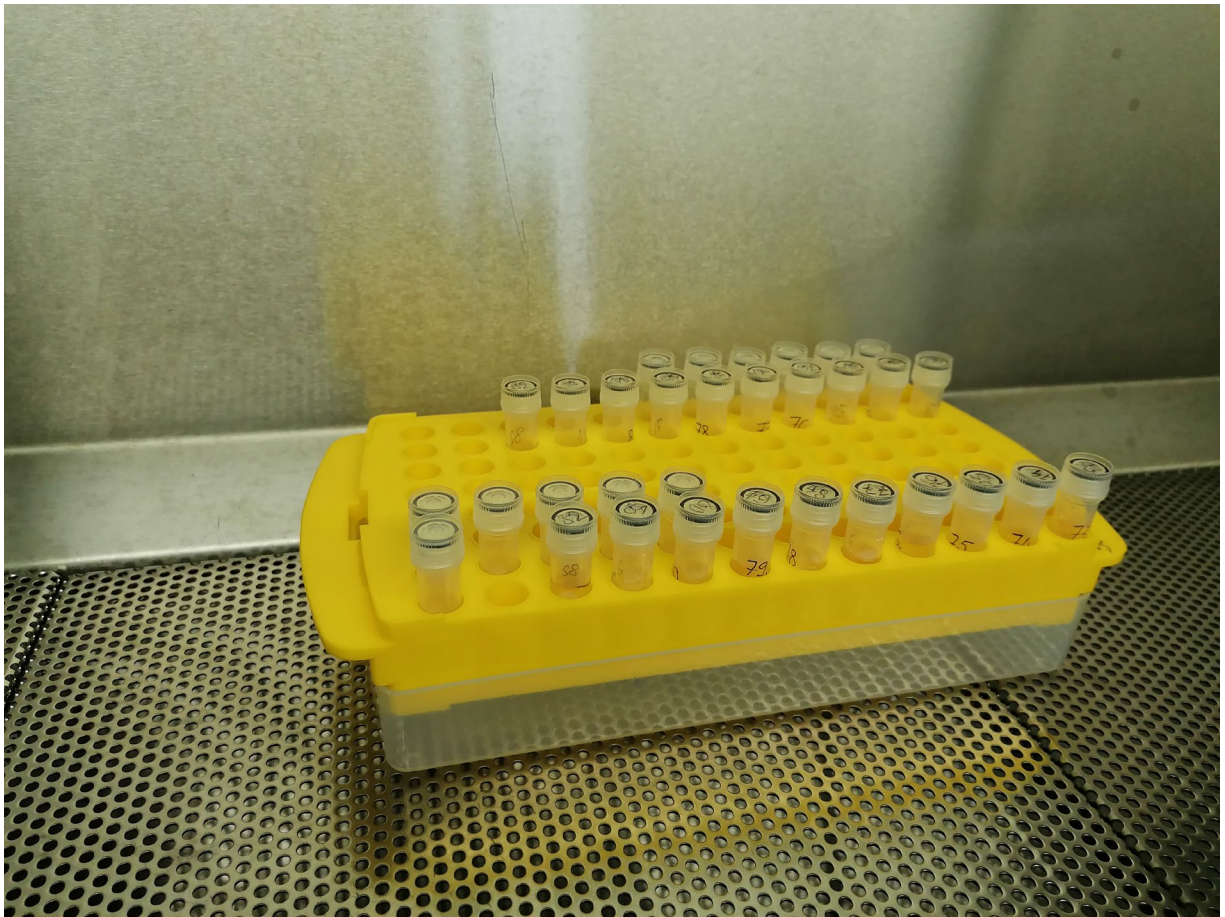
2.3. Dugoročna pohrana micelija

Nakon dobivanja čistih kultura micelija gljive *C. parasitica*, fotografirane su i spremljene na dugoročnu pohranu :

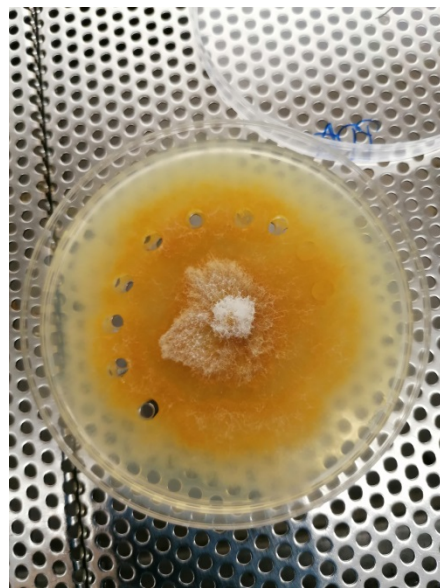
- 1) Komadići micelija u 15 % glicerola na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$
- 2) Komadići micelija u 50 % glicerola na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$
- 3) Komadići micelija u sterilnu vodu



Slika 16. Hladnjak za dugoročnu pohranu



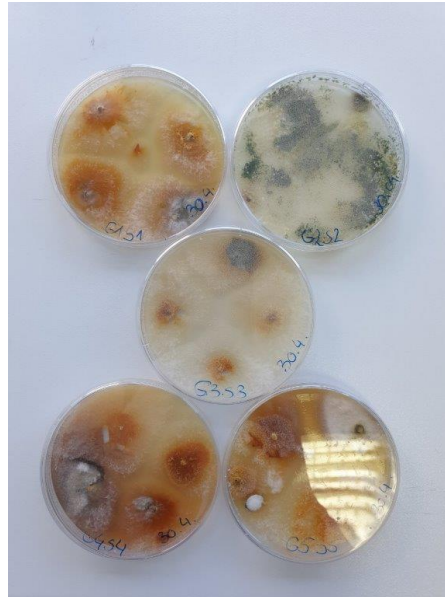
Slika 17. Epruvetice za dugoročnu pohranu



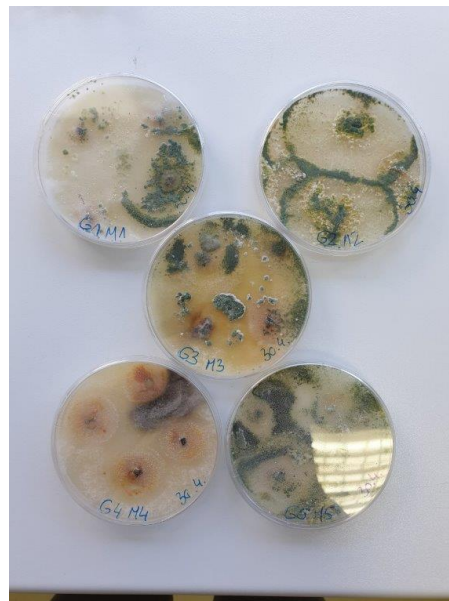
Slika 18. Uzimanje uzoraka za dugoročnu pohranu

3. REZULTATI

Na kraju istraživanja dobili smo 5 Petrijevki izolacijom iz stroma (Slika 19.) ,te 5 Petrijevki izolacijom iz micelija (Slika 20.)



Slike 19. Petrijevke sa uzorkom strome



Slika 20. Petrijevke sa uzorkom micelija

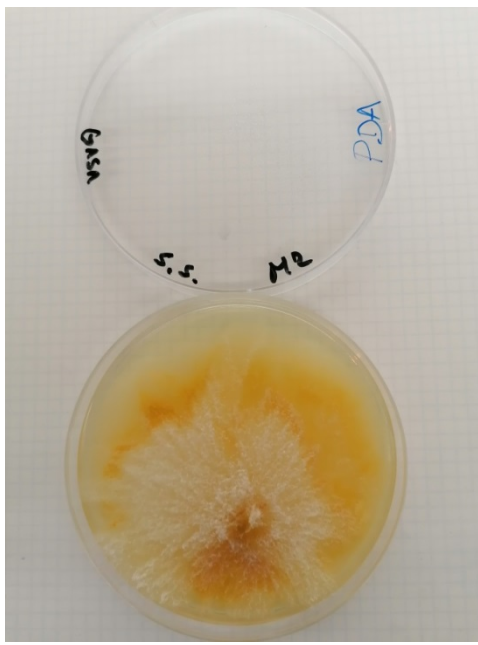
Presadivanjem je dobiveno deset čistih kultura micelja koje su spremljene na dugoročnu pohranu. Svaki micelij (čista kultura) je istovremeno presađen na dvije hranjive podloge : PDA i MEA.

3.1. Miceliji na PDA :

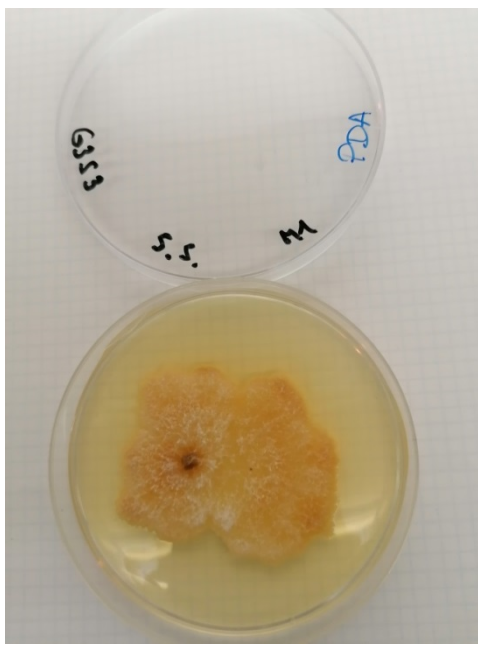
Micelij je razvio kratke hife , te se puno sporije širio na PDA hranjivoj podlozi nego na MEA, gdje vidimo da ima duplo više hifa.



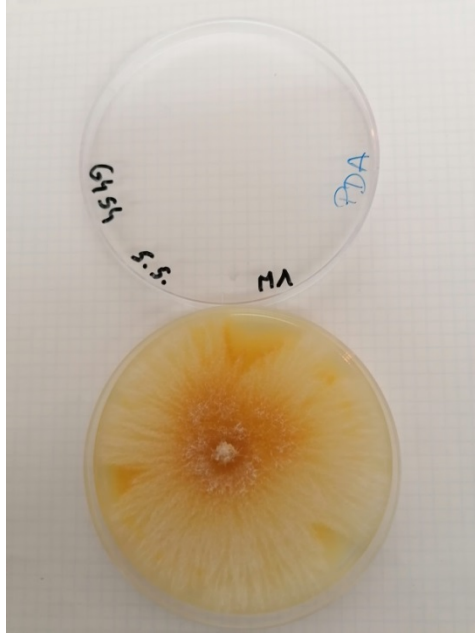
Slika 21. G1S1 M1 na PDA



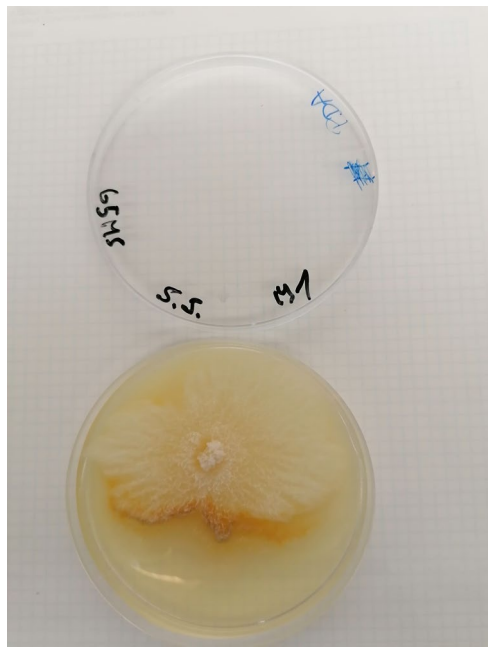
Slika 22. G1S1 M2 na PDA



Slika 23. G3S3 M1 na PDA



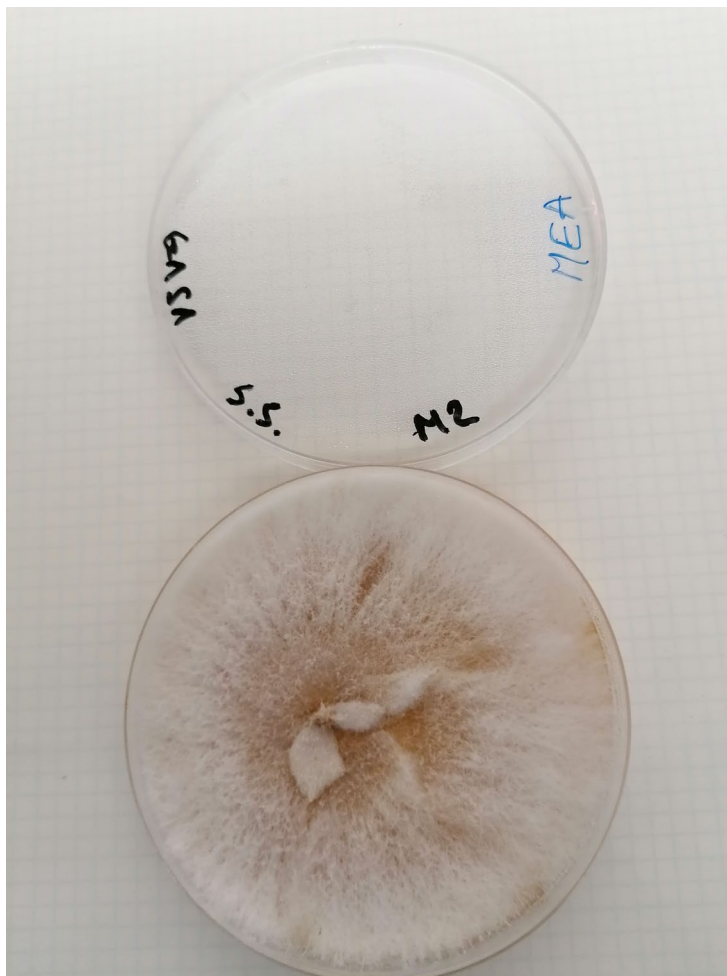
Slik 22. G4S4 M1 na PDA



Slika 25. G5M5 M1 na PDA

3.2. Miceliji na MEA :

Kao što prikazuje slika 26,27,28 i 29. na MEA podlozi micelij se razvio mnogo brže ,te je napravio značajnije više hifa nego na PDA hranjivoj podlozi.



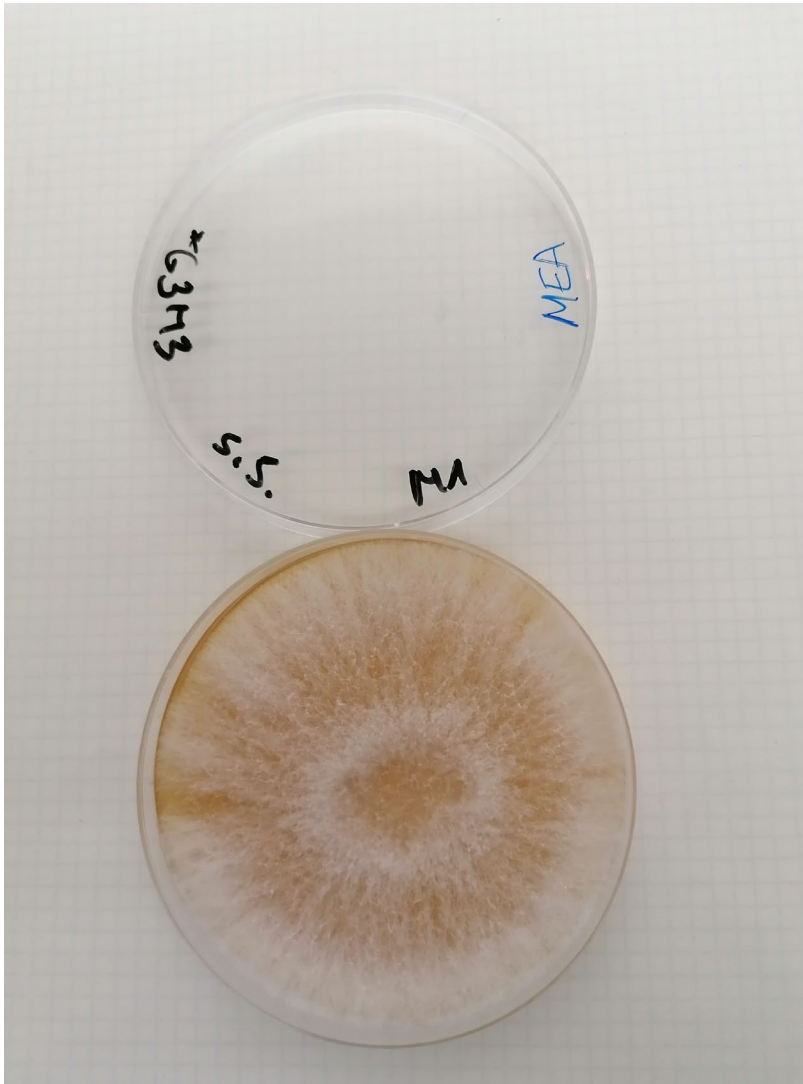
Slika 26. G1S1 M2 na MEA



Slika 27. G5S5 M1 na MEA



Slika 28. G3S3 M2 na MEA



Slika 29. G3S3 M1 na MEA

4. RASPRAVA

Pokus izolacije patogena iz strome i micelija iz kore zaraženih stabala i daljnje presađivanje na dvije različite hranjive podloge pokazali su značajne razlike.

Na MEA podlozi micelij se puno brže razvijao nego kod PDA podloge, tako da smo zaključili da *Cryphonectria parasitica* više odgovara podloga Malt extract agar , nego Potato dextrose agar.

Micelij se vrlo brzo razvijao na MEA podlozi, mogli smo već nakon tjedan dana primjetiti veliku razliku u rastu i razvoju micelija, a nakon još dva tjedna , dobili smo potpuno popunjene Petrijevke zdjelice micelijem.

5. ZAKLJUČAK

Zbog velike štetnosti zadnjih nekoliko desetljeća gljive *C. parasitica* potrebno je bilo pratiti ,te istraživati o patogenosti te gljive. U ovom pokusu , istraženo je kako se gljiva razvija na različitim hranjivim podlogama (PDA i MEA) u kontroliranim laboratorijskim uvjetima i različitim metodama. Doneseni su slijedeći zaključci. Gljivi više odgovara MEA hranjiva podloga od PDA hranjive podloge, što je ustanovljeno po brzini rasta i brzini širanja gljive u Petrijevoj zdjelici. Gljivu je bolje izolirati metodom sa stromama (plodišta) nego metodom izolacije iz micelija (komadića kore) jer je mogućnost kontaminacije manja. Nakon što je pokus završen, petrijevke zdjelice s micelijima su stavljene na dugoročnu pohranu za potrebe budućih istraživanja *C. parasitica*, te za potrebe uspoređivanja naših hrvatskih gljiva *C. parastitica* sa gljivama iz Europe.

6. LITERATURA

1. Diminić, D., Berta, A., 2007: Zdravstveno stanje pitomog kestena na području šumarije Hrvatska Kostajnica, TAKSACIJSKI ELEMENTI KAO POKAZATELJI PROIZVODNOSTI ŠUMA MUNIKE (*Pinus Heldreichii* Christ) NA PLANINI ČVRSNICI , Šumarski list br. 3–4, CXXXI (2007) ,189
2. Harapin , M. ,1991: Značaj biotičkih faktora u procesu sušenja šuma , Šumarski list CX-V (1991).107, 193
3. Jovanovac, M., Bolesti i štetnici pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.), 4-5
4. Poljak,I., Idžojtić, M., Zebec, M., Perković, N.2012: VARIJABILNOST EUROPSKOG PITOMOG KESTENA (*Castanea sativa* Mill.) NA PODRUČJU SJEVEROZAPADNE HRVATSKE PREMA MORFOLOŠKIM OBILJEŽJIMA PLODOVA , Šumarski list, 9–10 (2012): 479–489