

Istraživanje uzročnika crvene pjegavosti borovih iglica (*Dothistroma* spp.) na području Istre

Milošić, Lara

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:108:127357>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



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

LARA MILOŠIĆ

**ISTRAŽIVANJE UZROČNIKA CRVENE PJEGAVOSTI
BOROVIH IGLICA (*Dothistroma* spp.) NA PODRUČJU ISTRE**

DIPLOMSKI RAD

ZAGREB, 2016.

ŠUMARSKI FAKULTET SVEUČILIŠTA U ZAGREBU

ŠUMARSKI ODSJEK

**ISTRAŽIVANJE UZROČNIKA CRVENE PJEGAVOSTI
BOROVIH IGLICA (*Dothistroma* spp.) NA PODRUČJU ISTRE**

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. Jelena Kranjec, mag. ing. silv.

Student: Lara Milošić

JMBAG: 0068211992

Broj indeksa: 519/14

Datum odobrenja teme: 11. travnja 2016.

Datum predaje rada: 15. rujna 2016.

Datum obrane rada: 23. rujna 2016.

Zagreb, rujna, 2016.

Dokumentacijska kartica

NASLOV:	Istraživanje uzročnika crvene pjegavosti borovih iglica (<i>Dothistroma</i> spp.) na području Istre
TITLE:	Research on causal agent of red band needle blight of pine (<i>Dothistroma</i> spp.) in Istria
AUTOR:	Lara Milošić
ADRESA AUTORA:	Ulica Matije Gupca 1, Koprivnica
MJESTO IZRADE:	Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
VRSTA OBRANE:	Diplomski rad
MENTOR:	Prof. dr. sc. Danko Diminić
IZRADU POMOGAO:	Jelena Kranjec, mag. ing. silv.
GODINA OBJAVE:	2016.
OBUJAM:	52 stranice, 19 slika, 13 tablica, 6 grafa
KLJUČNE RIJEČI:	<i>Dothistroma septosporum</i> , <i>Dothistroma pini</i> , fitopatogene gljive, <i>Pinus</i> spp., plodna tijela (acervuli), crveni prstenovi, osutost, oborine, temperatura
KEY WORDS:	<i>Dothistroma septosporum</i> , <i>Dothistroma pini</i> , pathogenic fungi, <i>Pinus</i> spp., fruit bodies (acervuli), red bands, defoliation, rainfall, temperature
SAŽETAK:	Crvena pjegavost borovih iglica (<i>Dothistroma</i> spp.) je u Hrvatskoj veoma česta na crnom boru, planinskom boru i na hibridima, gdje uzrokuje prijevremeno osipanje iglica, smanjenje prirasta te nakon uzastopnih višegodišnjih napada i potpuno sušenje borova. Za potrebe ovog rada će se sakupljati borove iglice s tipičnim simptomima na području Istre, kako bi

	se utvrdio broj plodišta gljive po iglici i njihova zrelost te prisutnost plodišta drugih vrsta gljiva u jesen i u proljeće. Opisati će se morfologija spora (boja, oblik i veličina) različitih izolata te izmjeriti brzina njihovog rasta na hranjivim podlogama. Cilj rada je odrediti intenzitet zaraze ovom gljivom na uzorkovanim stablima u različitim periodima godine, te opisati određene aspekte njene morfologije i biologije, čije je poznavanje preduvjet za razvijanje specifičnih mjera zaštite.
--	---

SADRŽAJ

POPIS SLIKA

POPIS TABLICA

POPIS GRAFOVA

1. UVOD	1
2. CILJ RADA	3
3. UZROČNIK BOLESTI.....	4
3.1. Sistematska pripadnost i nomenklatura <i>Dothistroma</i> spp.....	4
3.2. Porijeklo i rasprostranjenost gljive	6
3.3. Domaćini patogene gljive	8
3.4. Simptomi bolesti	10
3.5. Proizvodnja toksina dotistromina.....	13
3.6. Morfološke i anatomske karakteristike patogena.....	14
3.7. Biologija patogene gljive.....	16
3.7.1. Širenje i klijanje spora	18
3.7.2. Rast micelija gljive.....	19
3.8. Čimbenici koji utječu na infekciju.....	21
3.9. Mogućnost širenja <i>Dothistroma</i> spp. u nova područja.....	22
3.10. Posljedice infekcija patogenih gljiva <i>Dothistroma</i> spp.	23
4. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA	25
4.1. Područje rada	25
4.2. Sakupljanje i analiza uzoraka	29
5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA.....	35
5.1. Pregled stabala i sakupljanje uzoraka na terenu	35
5.2. Analiza uzoraka u Laboratoriju za patologiju drveća na Šumarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.....	37
5.2.1. Simptomi na iglicama <i>Pinus nigra</i> Arnold.....	37
5.2.2. Determinacija patogenih gljiva na iglicama <i>Pinus nigra</i> Arnold	39
5.2.3. Određivanje broja plodišta i zrelosti plodnih tijela <i>Dothistroma</i> spp.....	41
5.2.3.1. Usporedba proljetnih i jesenskih uzoraka	42
5.2.4. Određivanje morfologije spora (boja, oblik, veličina) te brzine rasta izolata na hranjivim podlogama	45
6. RASPRAVA	48
7. ZAKLJUČAK.....	51
LITERATURA	

POPIS SLIKA

Slika 1. Svjetska rasprostranjenost patogene gljive *Dothistroma septosporum* (Dorog.)

Slika 2. Svjetska rasprostranjenost patogene gljive *Dothistroma pini* Hulbary

Slika 3. Infekcija patogenim gljivama *Dothistroma* spp. na vrsti *Pinus nigra* Arnold te umjerena do teška infekcija patogenim gljivama *Dothistroma* spp. na vrsti *Pinus radiata* D.Don

Slika 4. Rani simptomi na mjestu infekcije

Slika 5. Razvijeni simptomi *Dothistroma* spp. na borovim iglicama (crvenkasto-smeđi prstenovi, crne strome vidljive kao crne točke, eliptični acervuli poredani u paralelne redove duž osi iglice koji izbijaju kroz epidermu kroz jedan ili dva lateralna proreza, iglice koje sadrže gornji (mrtvi) i donji (živi) dio)

Slika 6. Simptomi *Dothistroma* spp. na različitim vrstama borova

Slika 7. Konidije koje se izlučuju u obliku blijedo-ružičaste ili bezbojne sluzave tvari, poprečni presjek acervula; bezbojne konidije s 1-5 pregrada te poprečni presjek borove iglice s plodnim tijelom

Slika 8. Peritecij s askusima te askospore

Slika 9. Ostvarenje infekcije i razvoj plodnih tijela *Dothistroma* spp. na borovoj iglici; 1. Klijanje konidija, 2. Rast hifa na površini iglice te kroz puči, 3. Kolonizacija šupljine unutar puči hifama, 4. Međustanične hife koloniziraju mezofil uz proizvodnju dotistromina koji ubija mezofilne stanice ispred rastuće hife, 5. Acervuli s konidijama

Slika 10. Položaj Istre na karti Republike Hrvatske te položaj grada Pazina (Novaki Pazinski)

Slika 11. Crvena Istra, Siva Istra te Bijela Istra uz izgled flišnog područja središnje Istre na lokaciji Novaki Pazinski

Slika 12. Područje rada Novaki Pazinski

Slika 13. Zamijećeni karakteristični simptomi *Dothistroma* spp. na lokaciji Novaki Pazinski u jesen

Slika 14. Zamijećeni karakteristični simptomi *Dothistroma* spp. na lokaciji Novaki Pazinski u proljeće

Slika 15. Žutosmeđe trake ili pjege te smeđi, crvenkasto-smeđi prstenovi uz prisustvo plodnih tijela

Slika 16. Crvenkasto-smeđi prstenovi s mnoštvom plodnih tijela acervula

Slika 17. Plodna tijela i konidije *Dothistroma* spp. s uzoraka na lokaciji Novaki Pazinski

Slika 18. Bilježenje rasta izolata ravnalom svaka dva tjedna u 4 međusobno nasuprotna smjera (gore, dolje, lijevo, desno).

Slika 19. Miceliji *Dothistroma* spp. s vidljivim crvenim pigmentima

POPIS TABLICA

Tablica 1. Domaćini patogene gljive *Dothistroma septosporum* (Dorog.) Morelet prema osjetljivosti

Tablica 2. Srednje maksimalne temperature zraka za meteorološku postaju Pazin (2015)

Tablica 3. Srednje minimalne temperature zraka za meteorološku postaju Pazin (2015)

Tablica 4. Srednje maksimalne temeprature zraka za meteorološku postaju Pazin (2016)

Tablica 5. Srednje minimalne temperature zraka za meteorološku postaju Pazin (2016)

Tablica 6. Deskriptivna statistika (broj uzoraka, prosjek, medijan, minimum, maksimum, varijanca, standardna varijanca, koeficijent varijacije) za broj plodišta po iglici za jesenske i proljetne uzorke

Tablica 7. Deskriptivna statistika (broj uzoraka, prosjek, medijan, minimum, maksimum, varijanca, standardna varijanca, koeficijent varijacije) za broj plodišta po iglici za jesenske uzorke

Tablica 8. Deskriptivna statistika (broj uzoraka, prosjek, medijan, minimum, maksimum, varijanca, standardna varijanca, koeficijent varijacije) za broj plodišta po iglici za proljetne uzorke

Tablica 9. Neparametrijski Mann Whitney U test

Tablica 10. Rezultati Mann-Whitney U testa za usporedbu proljetnih i jesenskih uzoraka prema broju plodišta različitih stadija zrelosti

Tablica 11. Rast pet izolata dobivenih u jesen 2015

Tablica 12. Rast tri izolata dobivenih u proljeće 2016. godine

Tablica 13. Deskriptivna statistika dimenzija spora

POPIS GRAFOVA

Graf 1. Srednja mjesečna količina oborina za meterološku postaju Pazin

Graf 2. Srednja mjesečna temperatura zraka za meteorološku postaju Pazin

Graf 3. Broj plodišta drugih patogenih gljiva na borovim iglicama 2015. i 2016. godine

Graf 4. Histogram distribucije broja plodišta *Dothistroma* spp. i krivulja normalne distribucije

Graf 5. Usporedba broja plodišta po iglici između proljetnih i jesenskih uzoraka iglica običnog bora

Graf 6. Histogrami broja plodišta po iglici običnog bora za proljetne i jesenske uzorke

1. UVOD

Dothistroma spp. uzročnik je crveno-smeđe prstenaste pjegavosti borovih iglica te je jedna od najvažnijih bolesti iglica borova (Barnes i sur., 2004). Svjetske je distribucije i od značajne gospodarske važnosti. Prvotno je zabilježena 1912. godine u Rusiji, a potom i 1917. godine u SAD-u nakon čega od polovice 20. stoljeća uzrokuje više lokalnih epifitocija u SAD-u, istočnoj Africi, Južnoj Americi i Novom Zelandu (Uščuplić, 1996). Rasprostranjena je i u Europi, a kod nas u Hrvatskoj prvi je put zabilježena 1963. godine. Utječe na 85 vrsta *Pinus* spp., ali je u izvjesnim situacijama identificirana i na vrstama *Pseudotsuga menziesii*, *Larix decidua* kao i vrstama iz roda *Picea* spp. (*Picea abies*, *Picea omorika*, *Picea pungens*, *Picea sitchensis* i *Picea shrenkiana*). Glavni domaćini u Europi su *Pinus nigra* (crni bor), *Pinus sylvestris* (obični bor) i *Pinus mugo* (planinski bor, bor krivulj), dalje slijede *P. canariensis*, *P. contorta*, *P. halepensis*, *P. muricata*, *P. pinea*, *P. ponderosa*, *P. radiata*, *P. thunbergii*. U Hrvatskoj, zaraza je česta na *Pinus nigra* (crni bor), *Pinus mugo* (planinski bor), na hibridima, na mladim borovim sadnicama u rasadnicima, na borovima u dobi do približno 20 godina, u kulturama, nasadima, parkovima, na pojedinačnim i u grupama rastućim stablima (Glavaš, 1999).

Dothistroma spp. kroničnog je karaktera, uzrokuje pojavu klorotičnih pjega na iglicama koje s vremenom posmeđe i oblikuju crvenosmeđi prsten što se pripisuje dotistrominu (toksin u produkciji ovog patogena), posljednjim istraživanjima demantirano je prisustvo crvenih prstenova kod svih infekcija, naime mnoga izvješća kažu da se najčešće javljaju kod medija s višom pH vrijednošću. U daljnjem procesu patogena, odumre gornja polovica iglice, a ponekad i cijela iglica. Ukoliko dođe do jačeg napada, osipaju se iglice bez obzira na starost stabla što utječe na visinski i debljinski prirast da bi u krajnjoj situaciji završilo odumiranjem domaćina.

Dothistroma spp., crveno-smeđa prstenasta pjegavost borovih iglica uzrokovana je djelovanjem dvije vrlo slične gljive iz odjela *Ascomycota*, *Dothistroma septosporum* (Dorog.) Morelet i *Dothistroma pini* Hulbary (Barnes i sur., 2004).

Dothistroma septosporum razvija anamorfnu stadij *Dothistroma septosporum* (G. Dorogine) M. Morelet (sinonimi: *Cytosporina septospora* G. Dorog, *Septoriella septospora* (G. Dorog.) Sacc, *Actinothyrium marginatum* Sacc., *Dothistroma pini* Hulbary, *Dothistroma pini* var. *lineare* Thyr & C. G. Shaw, *Dothistroma septosporum* var. *lineare* Thyr & C. G. Shaw, *Dothistroma pini* var. *keniense* M. H. Ivory.) te

telemorfni stadij *Mycosphaerella pini* E. Rostrup, koji se prema saznanjima javlja samo na određenim područjima distribucije patogena.

Dothistroma pini razvija anamorfni stadij *Dothistroma pini* Hulbary (sinonimi: *Mycosphaerella pini* E. Rostrup, *Eruptio pini* (Rostr.) M.E. Barr, *Scirrhia pini* Funk & A. K. Parker, *Dothistroma septosporum* (G. Doroguine) M. Morelet (as *septospora*'), *Cytosporina septospora* G. Dorog., *Septoriella septospora* (G. Dorog.) Sacc., *Actinothyrium marginatum* Sacc., *Dothistroma pini* var. *lineare* Thyr & C.G. Shaw, *Dothistroma septosporum* var. *lineare* Thyr & C.G. Shaw, *Dothistroma pini* var. *keniense* M. H. Ivory), dok je telemorfni stadij još uvijek nepoznat. *D. pini*, opisana je kao posebna vrsta tek nedavno (Barnes i sur., 2004), a zabilježena je u srednjem dijelu sjevernog SAD-a i nekim dijelovima Europe.

D. septosporum i *D. pini* usko su povezane i izazivaju istu bolest, crveno-smeđu prstenastu pjegavost borovih iglica. Osim toga, dvije vrste su veoma slične u morfologiji, a njihova identifikacija moguća je samo molekularnim metodama na temelju DNK. U zemljama u kojima se pojavljuju obje vrste, one su otkrivene u sličnim uvjetima te u slučaju Mađarske i na istim iglicama (Barnes i sur., 2011). Iz toga razloga, pretpostavlja se da su poznati uvjeti potrebni za *D. septosporum*, također pogodni i za *D. pini*.

Dothistroma spp., crveno-smeđa prstenasta pjegavost borovih iglica bila je od velike ekonomske važnosti mnogo godina, uglavnom na egzotičnim vrstama borova na južnoj hemisferi. Tijekom proteklih 20 godina dobiva na značenju i na sjevernoj hemisferi. U zemljama gdje bolest ima značajan ekonomski utjecaj, uspješne metode reguliranja bolesti uključuju dobro poznavanje životnog ciklusa patogena, aplikaciju fungicida, šumskouzgojne mjere i uporabu rezistentnih vrsta. Od izuzetne je važnosti poznavanje životnog ciklusa patogene gljive i uvjeta koji su potrebni za ostvarenje infekcija kako bi se djelovalo pravovremeno, preduhitrile novonastale infekcije i štete kao posljedice njezina djelovanja.

2. CILJ RADA

Na temelju zdravstvenog pregleda kultura crnoga bora na istarskom području tijekom 2015. i 2016. godine zabilježeno je prisustvo crveno-smeđe prstenaste pjegavosti borovih iglica, *Dothistroma* spp. Gljiva uzrokuje prijevremeno osipanje iglica, smanjenje prirasta te nakon uzastopnih višegodišnjih napada i potpuno sušenje borova. Kako bi se odredio intenzitet zaraze ovom gljivom na uzorkovanim stablima na području Istre u različitim periodima godine, sakupljene su iglice sa specifičnim simptomima u jesen i proljeće. Cilj rada je utvrditi broj plodišta po iglici, odrediti njihovu zrelost te identificirati prisustvo drugih vrsta gljiva. Uz plodišta promatrana je i morfologija spora (boja, oblik i veličina) različitih izolata te brzina njihova rasta na hranjivim podlogama. Razmotreni su određeni aspekti biologije, čije je poznavanje preduvjet za razvijanje specifičnih mjera zaštite i održanje stabilnog ekosustava.

3. UZROČNIK BOLESTI

3.1. Sistematska pripadnost i nomenklatura *Dothistroma* spp.

Kraljestvo : *Fungi*

Podkraljevstvo : *Dikaria*

Odjel : *Ascomycota*

Pododjel : *Pezizomycotina*

Razred : *Dothideomycetes*

Podrazred : *Dothideomycetidae*

Red : *Capnodiales*

Porodica : *Mycosphaerelaceae*

Rod : *Dothistroma*

Vrsta : *Dothistroma septosporum*

Dothistroma pini

Nomenklatura uzročnika *Dothistroma* spp. ima dugu i zbunjujuću povijest. Uzročnika kojega sada zovemo *Dothistroma septosporum* prvi je opisao kao *Cytosporina septospora* Doroguine 1911. na vrsti *P. mugo* ssp. *mugo* (sin. *P. montana* Mill.) na uzorcima sakupljenim u Sankt Petersburgu u Rusiji (Doroguine, 1911). Saccardo (1920) zaražene *Pinus ponderosa* iglice prikupljene 1917. u Idahu (SAD) opisuje kao *Actinothyrium marginatum*. *Cytosporina septospora* kasnije je prebačena rodu *Septoriella* Oudem kao *Septoriella septospora* (Dorog.) Sacc. (Trotter, 1931). Godine 1941. Hulbary je opisao anamorfni stadij kao *Dothistroma pini* na iglicama vrste *P. nigra* var. *austriaca* prikupljenim u Illinoisu (SAD) 1938. godine.

Veza između europskog i američkog naziva gljive dana je kada su Morelet (1967, 1969) i Gremmen (1968) shvatili da gljiva koja uzrokuje crvene prstenove u SAD-u i istočnoj Africi (i zove se *D. pini*) odgovara *Cytosporina septospora* u Europi obzirom na opisane karakteristike. Morelet (1969) je ispitivao uzorak iglica *Pinus sylvestris* prikupljenih 1914. godine u Rusiji (Doroguine originalan uzorak iglica iz 1911. godine je bio izgubljen) i zaključio da je gljiva doista bila ista kao i ona koja je opisana od strane Hulbary, problem je bio u klasificiranju u različite rodove: *Cytosporina*, *Brunchorstia* i *Septoria*. Morelet (1968b, 1969) predlaže *Dothistroma septospora* (Doroguine) Morelet, kombinirajući naziv *Dothistroma pini* (Hulbary, 1941) i *Cytosporina septospora* (Doroguine, 1911).

Tri varijeteta gljive *D. septospora* (tzv. *D. pini*) opisana su na temelju prosječne duljine konidija. Thyr i Shaw (1964) predložili su prva dva varijeteta: *D. pini* var. *pini* (sin. *D. septospora* var. *septospora*) s kratkim konidijama (15,4-28 x 2,6-4 µm) i *Dothistroma pini* var. *linearis* (sin. *D. septospora* var. *lineare*) s dugim konidijama (23-42 x 1,8-2,9 µm). Ivory (1967a) je predložio novi varijetet *D. pini* var. *keniensis* (sin. *D. septospora* var. *keniense*) sa srednjom duljinom konidija (15-47,5 x 1,5-3,5 µm). Postojale su rasprave o valjanosti varijeteta i prikladnosti razlikovanja na temelju duljine konidija, danas se više i ne prepoznaju (Funk i Parker, 1966; Gadgil, 1967; Sutton, 1980; Evans, 1984; Barnes, i sur., 2004).

Rostrup je opisao savršeni (telemorfni) stadij gljive na mrtvim borovim iglicama iz Danske, vjerojatno na vrsti *P. sylvestris*, kao *Mycosphaerella pini* (Munk, 1957; Evans, 1984). Uzorak je sakupljen 1880., a anamorfni stadij nije naveden (Munk, 1957; Evans, 1984). Godine 1966. Funk i Parker povezali su *Dothistroma pini* Hulbary sa savršenim stadijem, koji se zove *Scirrhia pini* (Funk i Parker, 1966). Barr (1996) predlaže novi rod *Eruptio* za telemorfni stadij te prebacuje *Scirrhia pini* u *Eruptio pini* (Rostr.). Filogenetska analiza od strane Goodwina, Dunklea i Zismanna (2001) podržava uključivanje gljive u rod *Mycosphaerella* i stoga telemorfni stadij je trenutno poznat kao *Mycosphaerella pini* E. Rostr.

Barnes i suradnici 2004. godine istražuju filogenetske odnose između izolata *Dothistroma* spp. s pet (5) kontinenata i trinaest (13) zemalja. Otkrili su da nema dokaza što se tiče varijeteta na temelju duljine konidija. Njihovi su rezultati pokazali da patogen obuhvaća dva različita podrijetla, predstavljajući dvije različite filogenetske vrste. Jedna vrsta, nazvana *Dothistroma septosporum*, nalazi se širom svijeta, telemorfni stadij je *Mycosphaerella pini* Rostr., druga vrsta je nazvana *Dothistroma pini*, njen telemorfni stadij još je uvijek nepoznat.

3.2. Porijeklo i rasprostranjenost gljive

Porijeklo gljive koja uzrokuje crveno-smeđu prstenastu pjegavost borovih iglica je nepoznato. Evans je 1984. godine predložio da gljiva dolazi iz šuma s vrha planina Srednje Amerike iznad 1500 m nadmorske visine. Našao je anamorfni i telemorfni stadij. Smatra se da se autohotne vrste borova na visokim nadmorskim visinama središnjih američkih šuma (*P. ayacahuie*, *P. devoniana*, *P. oocarpa* i *P. pseudostrobus* / *P. Maximinoi*) razvijaju zajedno s gljivom pa su stoga manje osjetljive (Evans, 1984).

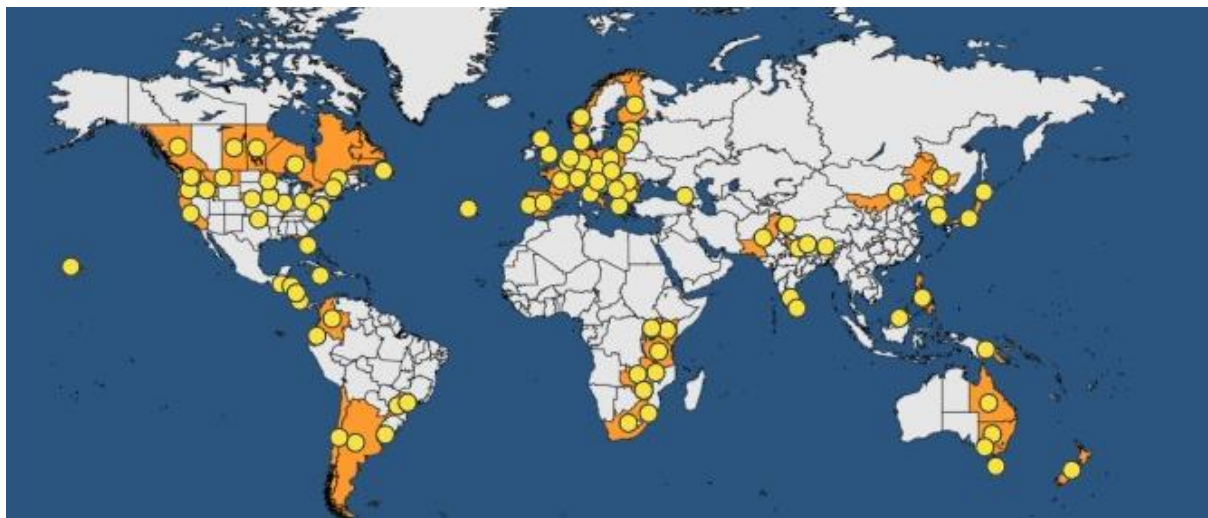
Ivory (1990, 1994) navodi drugo porijeklo, Himalaju (Nepal), gdje je pronašao gljivu u autohtonim *P. wallichiana* šumama. Zajedno s ranijim nalazima bolesti u Gruziji i nedavnim nalazima u Ukrajini gdje su otkrivene obje vrste *Dothistroma* spp., bolest može biti endemska na Himalaji šireći se bivšim sovjetskim državama kroz borovu šumu koja graniči sa šumama Himalaje (Ivory, 1994). Ivory (1990, 1994) nije promatrao telemorfni stadij u azijskim zbirkama. Time se smanjuje vjerojatnost da je gljiva endemska na području Himalaje.

Prvi zapisi o patogenu su iz uzoraka iglica prikupljenih u Danskoj 1880. godine; s iglica *P. sylvestris* iz Vogesa (sjeveroistočna Francuska) prikupljene 1907.; s iglica *P. mugo* iz St. Petersburga (Rusija) prikupljene 1910.; s iglica *P. ponderosa* iz Montane (SAD) prikupljene 1914. te s iglica *P. ponderosa* iz Idaha (SAD) prikupljene 1917. Iz navedenog, može se zaključiti da je uzročnik bio raširen mnogo desetljeća prije nego je prepoznat kao ozbiljan patogen 1960. godine.

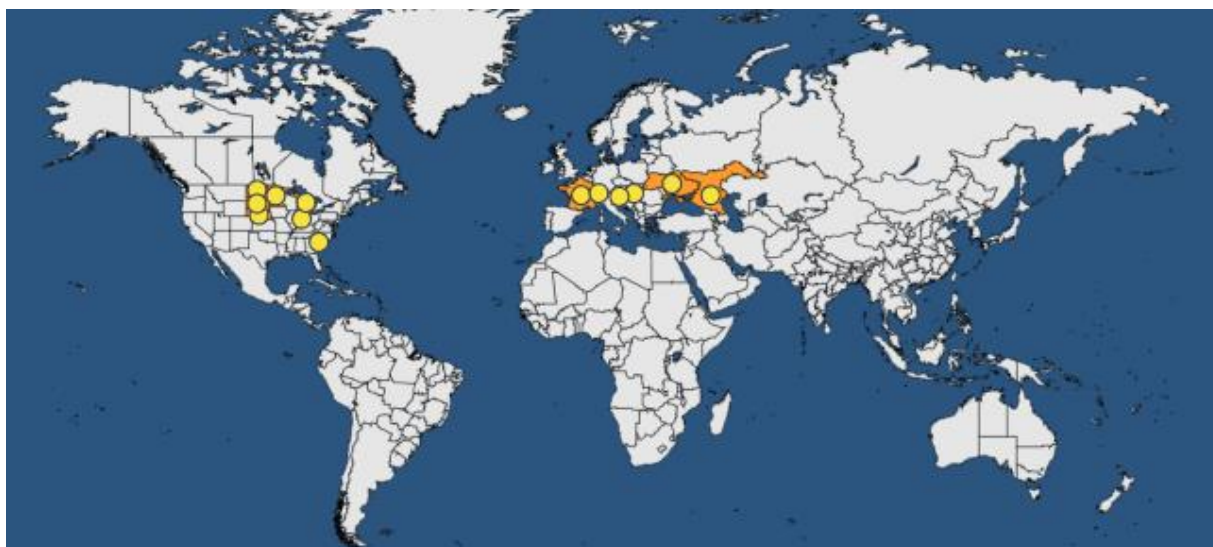
Bez obzira na porijeklo, patogen se proširio diljem svijeta. Utvrđen je na svim kontinentima (osim Antarktike), od razine mora do visoke nadmorske visine, u tropskoj, suptropskoj, mediteranskoj, umjerenoj, kontinentalnoj te subarktičkoj klimi. U Europi prisutstvo patogena ograničeno je samo u hladnim uvjetima, na velikim visinama u švicarskim Alpama i suhim istočnim regijama Španjolske.

Watt i sur. (2009) navode, obzirom na geografsku rasprostranjenost vrste *Dothistroma septosporum* (slika 1.), da se gljiva može širiti i predstavljati prijetnju u još više područja (jugoistok Kine, Vijetnam, Irska, zapadna Australija, Venezuela, Gvajana, Surinam, Panama, Turska, Albanija i područja oko Sredozemnog mora). Za sada potvrđena prisutnost *D. pini* uključuje Francusku, Mađarsku, Rusiju, Sloveniju, Švicarsku, Ukrajinu te Sjedinjene Američke Države (slika 2.). Pretpostavlja se da je

širenje patogena između zemalja najčešće putem zaraženog sadnog materijala (Ivory, 1967a).



Slika 1. Svjetska rasprostranjenost patogene gljive *Dothistroma septosporum* (Dorog.) Morelet (<https://gd.eppo.int/taxon/SCIRPI/distribution>)



Slika 2. Svjetska rasprostranjenost patogene gljive *Dothistroma pini* Hulbary (<https://gd.eppo.int/taxon/DOTSPI/distribution>)

3.3. Domaćini patogene gljive

Dothistroma spp. uglavnom je bolest roda *Pinus* L. *Dothistroma septosporum* zabilježena je na 85 vrsta borova, kao i na *Larix decidua*, *Pseudotsuga menziesii* i na vrstama iz roda *Picea* spp. (*Picea abies*, *Picea omorika*, *Picea pungens*, *Picea sitchensis* i *Picea shrenkiana*). Za razliku od *D. septosporum*, *D. pini* ima ograničen raspon domaćina koji uključuje vrste *Pinus nigra*, *P. mugo* i *P. pallasiana*.

Niz faktora utječe na osjetljivost domaćina i ozbiljnost bolesti. Eldridge i dr. (1981) navode da je najviša razina bolesti na vrsti *P. radiata* u sastojinama koje rastu na siromašnim tlima. Lambert (1986) je utvrdio visoku razinu infekcije u sastojinama s visokim koncentracijama arginina u iglicama uzrokovanih nedostatkom sumpora (i fosfora) kao posljedica prekomjerne primjene dušikova gnojiva. Čini se da sastojine koje imaju nedostatak sumpora, bilo iz prirodnih tala s manjkom sumpora ili zbog prekomjerne gnojidbe dušikom više su osjetljive na *Dothistroma* spp. Kod nekih vrsta osjetljivost ovisi o dobi domaćina. Kod vrste *P. radiata* osjetljivost je veća što su stabla mlađa, dok se sa starošću osjetljivost smanjuje. Dakle, osjetljivost nije samo u korelaciji s vrstama i podrijetlom već i uvjetima okoline (položaj, klima,...). Prirodne sastojine su manje osjetljive od egzotičnih plantaža, na primjer prirodne sastojine *P. radiata* nisu zaražene, no ova vrsta jako je osjetljiva kada je uzgojena u egzotičnom području (Cobb-Miller, 1968). Stoga se čini da su razina osjetljivosti i intenzitet infekcije rezultat interakcije između vrste domaćina, patogene gljive i okolišnih uvjeta (trokut bolesti).

Tablica 1. Domaćini patogene gljive *Dothistroma septosporum* (Dorog.) Morelet prema osjetljivosti

Visoko osjetljive	Umjereno osjetljive	Nisko osjetljive
<i>Pinus attenuata</i>	<i>Pinus bungeana</i>	<i>Larix decidua</i>
<i>Pinus x attenuradiata</i>	<i>P. canariensis</i>	<i>Picea abies</i>
<i>P. brutia</i>	<i>P. caribaea</i>	<i>P. omorika</i>
<i>P. canariensis</i>	<i>P. clausa</i>	<i>P. pungens</i>
<i>P. caribaea</i> var. <i>hondurensis</i>	<i>P. coulteri</i>	<i>P. shrenkiana</i>
<i>P. caribaea</i> var. <i>caribaea</i>	<i>P. cubensis</i>	<i>P. sitchensis</i>
<i>P. caribaea</i> var. <i>bahamensis</i>	<i>P. densiflora</i>	<i>Pinus aristata</i>
<i>P. cembroides</i>	<i>P. echinata</i>	<i>P. ayacahuite</i>
<i>P. contorta</i>	<i>P. echinata x taeda</i>	<i>P. contorta</i>
<i>P. contorta</i> var. <i>latifolia</i>	<i>P. elliotii</i>	<i>P. coulteri</i>
<i>P. engelmannii</i>	<i>P. elliotii</i> var. <i>densa</i>	<i>P. devoniana</i>
<i>P. halepensis</i>	<i>P. flexilis</i>	<i>P. elliotii</i>
<i>P. jeffreyi</i>	<i>P. jeffreyi</i>	<i>P. elliotii</i> var. <i>densa</i>
<i>P. muricata</i>	<i>P. kesiya</i>	<i>P. hartwegii</i>
<i>P. nigra</i>	<i>P. lambertiana</i>	<i>P. heldreichii</i>
<i>P. nigra</i> subsp. <i>laricio</i>	<i>P. massoniana</i>	<i>P. koraiensis</i>
<i>P. pinea</i>	<i>P. monticola</i>	<i>P. merkusii</i>
<i>P. ponderosa</i>	<i>P. mugo</i>	<i>P. montezumae</i>
<i>P. radiata</i>	<i>P. mugo</i> subsp. <i>mugo</i>	<i>P. monticola</i>
<i>P. sabineana</i>	<i>P. muricata</i>	<i>P. nigra</i> subsp. <i>nigra</i>
<i>P. strobus</i>	<i>P. occidentalis</i>	<i>P. oocarpa</i>
<i>P. sylvestris</i>	<i>P. palustris</i>	<i>P. patula</i>
<i>P. thunbergii</i>	<i>P. pinaster</i>	<i>P. pseudostrobus</i>
	<i>P. ponderosa</i> var. <i>scopulorum</i>	<i>P. rigida</i>
	<i>P. pungens</i>	<i>P. sabineana</i>
	<i>P. radiata</i> var. <i>binata</i>	<i>P. serotina</i>
	<i>P. resinosa</i>	<i>P. sibirica</i>
	<i>P. roxburghii</i>	<i>P. strobus</i>
	<i>P. strobiformis</i>	<i>P. strobus</i> var. <i>chiapensis</i>
	<i>P. strobus</i>	<i>P. sylvestris</i>
	<i>P. taeda</i>	<i>P. tabuliformis</i>
		<i>P. taeda</i>
		<i>P. torreyana</i>
		<i>P. wallichiana</i>
		<i>Pseudotsuga menziesii</i>

3.4. Simptomi bolesti

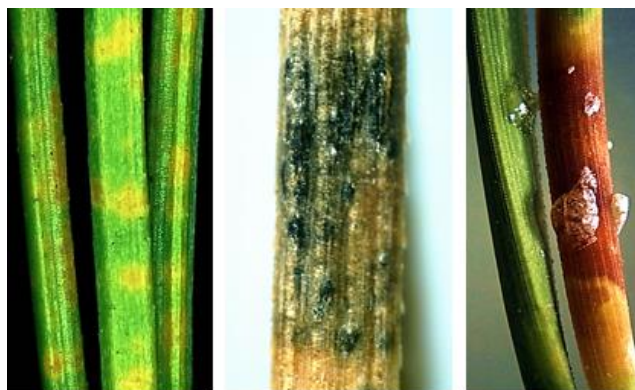
Kada se pojave simptomi patogene gljive *Dothistroma* spp., oni su slični onima koje uzrokuju druge patogene gljive na borovima (npr. *Mycosphaerella dearnessii*, *Cercoseptoria pini-densiflorae*, itd.), nepovoljni uvjeti okoliša ili nedostatak hranjiva (npr. nedostatak bora ili sumpora) (Pehl i Wulf, 2001). Pouzdana detekcija i identifikacija *D. septosporum* i *D. pini* moguća je jedino molekularnim metodama. Prema tome, sljedeće morfološke karakteristike odnose se na obje vrste.

Na razini stabla iglice bilo koje dobi mogu biti zaražene. Međutim, starije iglice uglavnom su zaražene prve (Gadgil, 1984; Timmerman, 2011) te se simptomi bolesti obično najprije vide u bazi krošnje (Peterson, 1982; Gadgil 1984; Bulman 1993; Timmerman, 2011). Progresijom bolesti infekcija se širi i na mlađe iglice (Gadgil, 1984; Hunt i sur., 2011). Kako su starije bolesne iglice otpale ostaju samo nedavno zaražene iglice tekuće vegetacije, često samo na vrhu stabla, ostavljajući prorijeđen izgled krošnje (slika 3.). Bolest je obično ujednačena u sastojini, no pojedina stabla pojavljuju se kao otpornija na gljivu od drugih (Bulman, 1993).



Slika 3. Infekcija patogenim gljivama *Dothistroma* spp. na vrsti *Pinus nigra* Arnold (<http://www.ipmimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=2111012>) te umjerena do teška infekcija patogenim gljivama *Dothistroma* spp. na vrsti *Pinus radiata* D. Don (<http://www.nzffa.org.nz/farm-forestry-model/the-essentials/forest-health-pests-and-diseases/diseases/Needle-diseases/Dothistroma/dothistroma-needle-blight/>)

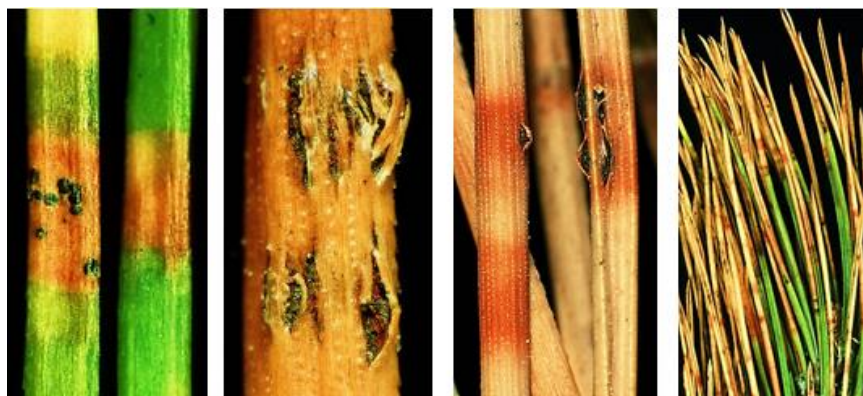
Na razini iglice, do jeseni rani simptomi na mjestu infekcije na živim iglicama mogu biti vidljivi kao vodom natopljene ili prozirne mrlje i male klorotične žute ili žutosmeđe trake ili pjege sa zelenim dijelovima (slika 4.). Zeleni dijelovi mogli bi biti posljedica povećanja sadržaja klorofila (Kabir i sur., 2015).



Slika 4. Rani simptomi na mjestu infekcije (<https://gd.eppo.int/taxon/SCIRPI/photos>)

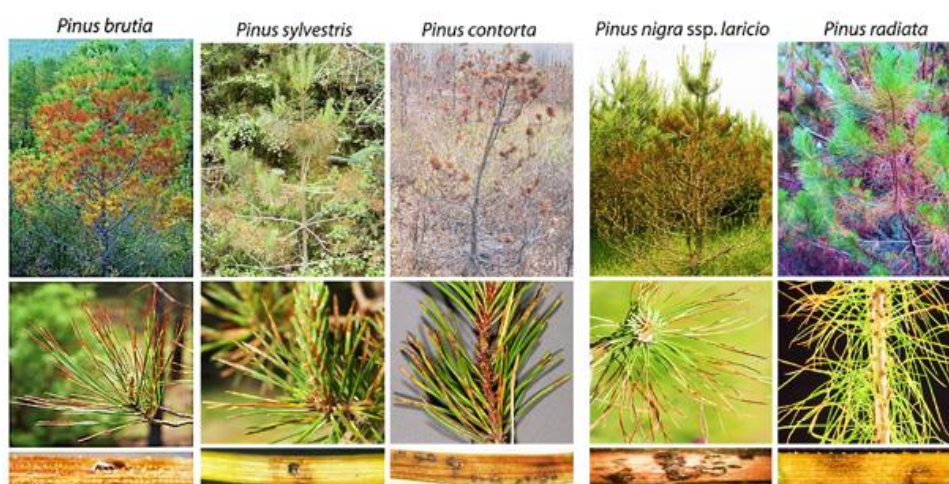
Navedeni simptomi imaju tendenciju da su kratkotrajni i pretvore se u smeđe, crvenkasto-smeđe prstenove promjera 1-2 mm (Peterson, 1982; Gadgil, 1984; Bulman, 1993). Crvenilo postaje vidljivo kada je biljka izložena suncu, zahvaljujući fitotoksičnim učincima toksina dotistromina kojega stvara gljiva, a može ostati vidljivo i nakon što je iglica odumrla i pala sa stabla (Murray i Batko, 1962). Smatra se da nastajanje crvenih prstenova ovisi o vrsti domaćina i okolišu u kojem stablo raste. Izloženost jakom svjetlu povećava crvenilo uzrokovano toksinom dok ih hlad suzbija. U nekim slučajevima crvenilo je smanjeno na male dijelove koji okružuju plodište. U međuvremenu odumre gornja polovica iglice, a nekada i cijela iglica. Karakterističan simptom su iglice koje sadrže smeđi, gornji (mrtvi) i zeleni, donji (živi) dio. Ovaj simptom najuočljiviji je na dvogodišnjim i trogodišnjim iglicama u proljeće i ljeto (Brown i Webber, 2008). U crvenim kao i smeđe obojenim i odumrlim dijelovima iglice, ispod epiderme se razvijaju crne strome vidljive kao crne točke. Kasnije, eliptični acervuli poredani u paralelne redove duž osi iglice izbijaju kroz epidermu kroz jedan ili dva lateralna proreza te podižu sloj epidermalnog i hipodermalnog tkiva noseći na sebi uske trake ispucale epiderme. Iglice se tada često prerano osipaju u kasno ljeto i jesen. Kod teško oboljelih stabala iglice svih prethodnih godina otpadnu prerano, ostavljajući samo čuperke novooboljelih ovogodišnjih iglica. Krošnja je jako svijetla, a stablo zbog iscrpljenosti svake godine stvara sve manji broj iglica, koje su

sve kraće pa na kraju stablo odumire. Kod manje ozbiljnih napada, osipanje iglica može biti odgođeno za godinu ili dvije.



Slika 5. Razvijeni simptomi *Dothistroma* spp. na borovim iglicama (crvenkasto-smeđi prstenovi, crne strome vidljive kao crne točke, eliptični acervuli poredani u paralelne redove duž osi iglice koji izbijaju kroz epidermu kroz jedan ili dva lateralna proreza, iglice koje sadrže gornji (mrtvi) i donji (živi) dio) (<https://gd.eppo.int/taxon/SCIRPI/photos>)

Vrijeme od infekcije do razvoja simptoma, inkubacija, varira i ovisi prvenstveno o klimi. Brži razvoj simptoma povezan je s višim temperaturama, ali ovisi i o intenzitetu svjetlosti i domaćinu. Razdoblje inkubacije može biti kratko dva tjedna pod kontroliranim uvjetima (24 °C i kontinuirana vlažnost iglica) (Gadgil, 1974), dok u prirodnim uvjetima, razdoblje inkubacije može biti kratko, četiri tjedna te dugo do trideset osam tjedana. U Republici Hrvatskoj najčešće vrijeme inkubacije je 1-4 mjeseci.



Slika 6. Simptomi *Dothistroma* spp. na različitim vrstama borova

([http://www.fabinet.up.ac.za/publication/pdfs/2218-fraser et al 2015 resistance mechanisms doth-pinus interaction.pdf](http://www.fabinet.up.ac.za/publication/pdfs/2218-fraser%20et%20al%202015%20resistance%20mechanisms%20doth-pinus%20interaction.pdf))

3.5. Proizvodnja toksina dotistromina

Dothistroma spp. proizvode toksin poznat kao dotistromin (Bradshaw i sur., 1997), koji daje crvenu boju zaraženim iglicama (Shain i Franich 1981). Gljiva ga proizvodi nakon zaraze iglice, a uzrokuje odumiranje stanica mezofila te na taj način omogućava lakši rast micelija (Partridge, 1998). Schwelm i sur. (2009) uočili su da dotistromin proizveden in vitro s drugim patogenim gljivama koje obično nastanjuju iglice, ubrzava rast micelija, što sugerira da toksin ima ulogu u konkurenciji s drugim mikroorganizmima. Kabir, Ganley i Bradshaw (2014) dolaze do zaključka da dotistromin ima ulogu u virulentnosti patogene gljive. Naseljavanje gljive u mezofil iglice smanjeno je kod oskudnosti dotistromina, što rezultira manjim lezijama, a isto tako i manjoj produkciji spora. Stoga je vjerojatno da dotistromin ima ulogu kako u konkurenciji s drugim mikroorganizmima tako i u virulentnosti (Schwelm, Barron, Baker i sur., 2009; Kabir, Ganley i Bradshaw, 2014).

Crveni prstenovi ne moraju biti uvijek prisutni na iglicama zaraženim *D. septosporum* (Brown i Webber, 2008; Drenkhan i Hanso, 2009). Smatra se da nastajanje crvenih prstenova ovisi o vrsti domaćina i okolišu u kojem stablo raste. Pehl i Butin (1992) rijetko nalaze crvene prstenove na *Pinus mugo* Turra na jugu Njemačke. U Austriji, Kirisits i Cech (2006, 2007) primijećuju jasno crvene nekrotične pjege na *Pinus nigra* Arn. iglicama, dok su iglice *Pinus cembra* L. zaražene *D. septosporum* uglavnom smeđe boje s manje vidljivim crvenim diskoloracijama. Bulman i sur. (2008) iznose da na Novom Zelandu nekrotični dijelovi su bili crveniji na *P. nigra* u odnosu na *P. radiata* D. Don., dok Barnes i sur. (2008) primijećuju da dijelovi na iglicama *P. peuce* Griseb. u Austriji, *P. wallichiana* A. B. Jacks u Butanu su smečkaste i nedostajalo im je crvenkaste boje. Prema istim autorima, nejasni simptomi *Dothistroma* spp. na *P. wallichiana* djelomično se mogu objasniti zbog prisutnosti drugih patogena na iglicama (*Lophodermium* spp.,...).

Ispitivanja su pokazala da dotistromin može izazvati oštećenje kromosoma u ljudskim stanicama (Bradshaw i sur., 2000). Dotistromin je slab mutagen i klastogen, a time i potencijalno kancerogen. To je dovelo do zabrinutosti za zdravlje šumskih radnika koji su izloženi jako zaraženim stablima. Međutim, Elliot i sur. (1989) ukazuju da postoji mali rizik za ljudsko zdravlje i da se potrebno pridržavati pravila kako bi se

smanjila potencijalna opasnost (rad u suhim uvjetima, nošenje pamučne odjeće koju je potrebno redovito prati, itd.).

Poznato je da se, osim kod *D. septosporum* i *D. pini*, dotistromin proizvodi i kod drugih gljiva kao što je *Passalora arachidicola*, *Mycosphaerella laricina* i *Cercospora* spp.

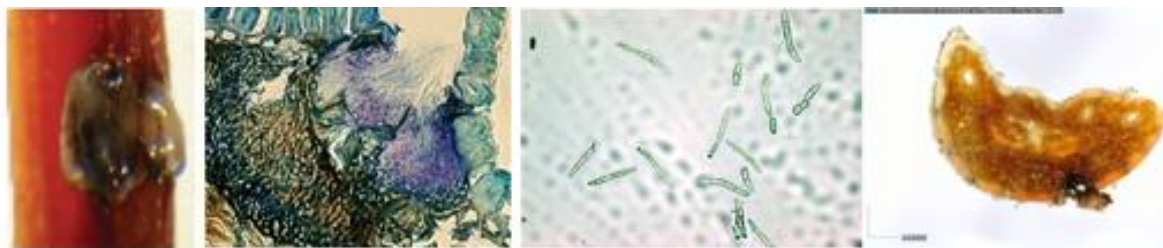
3.6. Morfološke i anatomske karakteristike patogena

Dothistroma spp., crveno-smeđa prstenasta pjegavost borovih iglica uzrokovana je djelovanjem dvije vrlo slične gljive *Dothistroma septosporum* (Dorog.) Morelet i *Dothistroma pini* Hulbary (Barnes i sur., 2004). Do danas, poznata su dva nesavršena (anamorfna) stadija, *Dothistroma septosporum* (G. Doroguine) M. Morelet i *Dothistroma pini* Hulbary, od kojih samo *Dothistroma septosporum* ima poznati savršeni (telemorfni) stadij *Mycosphaerella pini* E. Rostrup. Savršeni (telemorfni) stadij *Dothistroma pini* još je nepoznat.

Gljiva razvija nesavršeni (anamorfni) i savršeni (telemorfni) stadij. Oba stadija nastaju u tkivu zaraženih iglica i to u istim stromama. Strome su u iglici smještene subepidermalno, a razvijaju se na crvenkasto smeđim pjegama prošlogodišnjih, rjeđe ovogodišnjih iglica. Stroma se razvija između mezofila i hipoderme. Strome su tamnosmeđe, duge 0,2-0,6 mm, a široke 0,3 mm.

Anamorfni stadij, *Dothistroma septosporum* i *Dothistroma pini*, razvija u stromi 5-10 acervula. Acervuli su 125-1500 µm dugi × 50-450 µm široki i do 600 nm visoki. U njima su brojne konidije koje se izlučuju u obliku blijedo-ružičaste ili bezbojne sluzave tvari u vlažnim uvjetima. Konidije su obično bezbojne, ravne ili zakrivljene, hijaline, tankostijene, cilindrične ili lagano deblje pri vrhu nego pri dnu s 1-5 pregrada. Obično su dvostanične, rjeđe trostanične ili četverostanične, veličine 12–28–48 (do 64) µm × 2–3 µm. Nastaju na konidiogenim stanicama tipa holoblastik. Kada su acervuli zreli čitava stroma nabubri i vrši pritisak na epidermu, ona se nadigne i raspuca kroz jedan lateralni ili središnji prorez, rjeđe kroz dva proreza. Tada se na iglici vide kao tamnosmeđe ili crne nepravilne izbočine, kružna ili eliptična oblika. Raskinuta epiderma i kutikula iglica mogu ostati pričvršćene na jednoj strani ili vrhu strome (Hulbary, 1941; Edwards i Walker, 1978). Na većini lokacija, acervuli se mogu uočiti u kasnu jesen ili zimu, a najviše dolaze do izražaja sljedeće proljeće i ljeto,

konidije se obično proizvode samo sljedeće proljeće, godinu nakon ostvarenih infekcija.

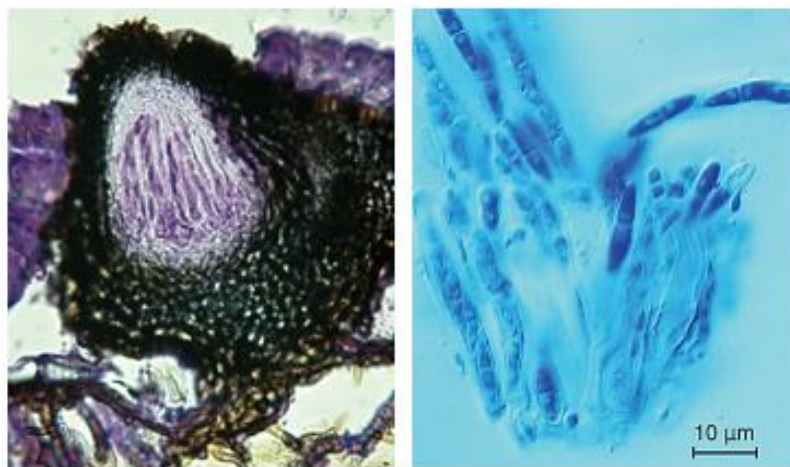


Slika 7. Konidije koje se izlučuju u obliku blijedo-ružičaste ili bezbojne sluzave tvari, poprečni presjek acervula (<http://photos.eppo.int/index.php/search/Mycosphaerella+pini>); bezbojne konidije s 1-5 pregrada te poprečni presjek borove iglice s plodnim tijelom (Milošić, 2015, Kranjec, 2016)

Kao što je ranije spomenuto telemorfni stadij je mnogo rjeđi u cijelom svijetu. Telemorfni stadij *Mycosphaerella pini* može se razviti samo u područjima u kojima su prisutni i nespolni acervuli. Spermacije (mikrokonidije) se formiraju u spermagoniju, hijaline su, štapićaste, $1,0-2,5 \times 0,5-1 \mu\text{m}$, oslobađaju se kroz malu pukotinu i prikupe se u sluzavoj kapljici na površini (Funk i Parker, 1966; Punithalingam i Gibson, 1973; Evans, 1984). Trihogine (forma receptivnih hifa) su u zasebnoj stromi, pregrađene su, obojene, s hijalnim vrškom, prodiru kroz epidermu; one mogu biti i do $110 \mu\text{m}$ duge $\times$ $2,5-5,0 \mu\text{m}$ debele (Funk i Parker, 1966). Vjerojatno je da spermacije oplode trihogine i omogućuje nastajanje askusa (Funk i Parker, 1966).

Spolna plodišta periteciji razviju se u istim stromama gdje nastaju i acervuli i oba proizvode spore istovremeno. Savršeni se oblik po vanjskom izgledu jedva razlikuje od nesavršenog. Periteciji su smješteni subepidermalno, crni su, okruglastog ili vrčastog oblika, s više lokula i opsega $200-600 \times 95-150 \mu\text{m}$. U zrelosti nabubre i izbiju na površinu iglice. U peritecijima nastaju askusi, koji su cilindrični, kesasti, izmiješani između lanaca polukuglastih bezbojnih stanica (pseudoparafiza). Oni imaju dvostruku stijenku (bitunicate), veličine $35-55 \times 6-9 \mu\text{m}$, sa zaobljenim vrškom i sadrže 8 askospora poredanih u dva niza. Askospore su bezbojne, vretenaste do eliptične, dvostanične, na septi malo sužene, a pojedine su stanice nejednake i zaobljenih vrhova. Veličina askospora je $11-16 \times 3-4 \mu\text{m}$. Imaju jednu pregradu, dvije stanice time su nejednake veličine, gornja je malo šira i dulja od

donje, svaka stanica tipično ima dvije kapljice ulja (tj. askospore su obično s četiri kapljice ulja unutar stanice).



Slika 8. Peritecij s askusima te askospore
(<http://photos.eppo.int/index.php/search/Mycosphaerella+pini>)

3.7. Biologija patogene gljive

Gljiva *Dothistroma septosporum* ima jednogodišnji ciklus razvoja. Razvija anamorfni stadij *Dothistroma septosporum* i njen telemorfni stadij *Mycosphaerella pini*. Gljiva *Dothistroma pini* razvija anamorfni stadij *Dothistroma pini* dok telemorfni stadij još uvijek je nepoznat. U većini slučajeva, konidije su glavni izvor zaraze. Telemorfni stadij vrste *Dothistroma septosporum* pronađen je u Kanadi, SAD-u (Kalifornija, Oregon i Aljaska), Francuskoj, Rumunjskoj, Njemačkoj, Gruziji, Srbiji, Poljskoj, Portugalu, Danskoj, Hondurasu, Kostariki i Jamajki.

Kod anamornog stadija u tkivu zaraženih iglica na stablu razvijaju se strome s acervulima u kojima se nalazi velik broj egzogenih spora konidija. Konidije sazrijevaju i izlučuju se u obliku bijele ili svjetlo roze sluzave mase za maglovita vremena ili kiše, otjecanjem i disperznim raspršivanjem. Bolest se na velike i male udaljenosti prenosi i zaraženim sadnicama. Konidije ostaju vitalne 2-6 mjeseci na oboljelom lišću koje leži na šumskom tlu pod vlažnim uvjetima. Međutim, ako su iglice na suhom, vitalnost se čuva najmanje 11 mjeseci (Gibson i sur., 1964).

Glavno razdoblje za infekciju je općenito od kasnog proljeća do kraja ljeta, odnosno travanj-kolovoz na sjevernoj hemisferi i studeni-veljača na južnoj hemisferi,

ali vrijeme raspršivanja spora može varirati čak i unutar jedne zemlje (Peterson i Harvey, 1976). Za klijanje i zarazu dospelih konidija na iglice borova trebaju postojati povoljni vanjski čimbenici. Inficiranje iglica doživljava svoj maksimum u travnju pa sve do početka lipnja. Inkubacijski period (vrijeme do pojave prvih simptoma) u našim prilikama traje 1-4 mjeseci te se prvi simptomi najčešće zamjećuju od jeseni. Patogen prezimi u zaraženim iglicama na stablu sve do sljedećeg proljeća (tj. godinu dana) i za to vrijeme u iglicama se razviju strome s acervulima u kojima nastaju konidije. Slijedi cijeli jednogodišnji ciklus patogeneze. Tijekom zime, zaražene jednogodišnje i dvogodišnje iglice ostaju još na stablu i glavni su izvor zaraza sljedeće proljeće i ljeto kada dođe do otpuštanja spora. Konidije mogu ostati žive nekoliko mjeseci na iglici na stablu, ali nakon što iglica otpadne sa stabla ubrzo odumiru i patogen biva zamijenjen konkurentnim gljivama koje naseljuju mrtve iglice.

Patogena gljiva se također može reproducirati i spolno, stvarajući vrstu spora poznatije kao askospore. Međutim, da bi se spolno razmnožavanje odvijalo, moraju biti prisutna oba stadija (spolni i nespolni). Dakle, telemorfni stadij razvija se na otpalim iglicama u istim stromama u kojima se razviju i acervuli. U zaraženom tkivu razvija se peritecij u kojem su askusi s askosporama. U ožujku slijedi oslobađanje i rasijavanje askospora. Zaraza se ostvaruje u lipnju. Za razliku od nesporno proizvedenih konidija koje imaju lokalizirano širenje kapljicama kiše, askospore se šire vjetrom i tako imaju potencijal za širenje bolesti na mnogo veće udaljenosti.

Ukoliko je zaraza ostvarena konidijama ili askosporama, u tkivu kada je iglica na stablu razviju se samo strome s acervulima (pseudopiknidama po nekim autorima), a strome s peritecijem jedino na otpalim iglicama. Prema tome, patogen prezimi na zaraženim iglicama na stablu ili otpalim iglicama. Askospore nemaju veliko značenje iako i one šire zarazu (Gibson, 1974). U nas telemorfni stadij nije zabilježen. Na *Pinus nigra* u Njemačkoj, konidijsko stanje zabilježeno je tijekom prve godine infekcije, a periteciji su formirani kasnije te je predloženo da je telemorfni stadij *Mycosphaerella pini* saprotrofski (dolazi na mrtvim iglicama) dok je anamorfni stadij *Dothistroma septosporum* parazitski (dolazi na živim iglicama) (Butin, 1985).

3.7.1. Širenje i klijanje spora

Kiša, magla ili sumaglica neophodne su za širenje patogena. Spore se oslobađaju kada kapljice vode padnu na površinu iglice i plodna tijela su navlažena. Konidije se zatim distribuiraju otjecanjem i disperznim raspršivanjem. Veća količina zaraze zabilježena je na nižim izbojcima, što je iznenađujuće obzirom da je proces disperznog raspršivanja suprotan gravitaciji. Mikroklima nižih izbojaka vjerojatno je povoljnija za infekciju od mikroklima gornjih izbojaka, prvenstveno radi smanjenog utjecaja vjetra i sunčevog zračenja što dovodi do slabijeg isparavanja i povećane površinske vlage koji pogoduju klijavosti konidija i ostvarenju infekcija. Za učinkovito raspršivanje konidija iglice moraju biti pričvršćene za stablo jer iako otpale iglice još uvijek mogu djelovati kao izvor inokuluma, raznošenje od razine tla do novih iglica u krošnji je ograničeno. Stoga se intenzitet inokuluma (a time i infekcija) smanjuje tijekom razdoblja intenzivnog osipanja iglica u kasno ljeto. Otpale iglice uhvaćene u gustoj mreži grana stabala su prijetnja jer konidije ostaju sposobne za ostvarenje infekcija dulji period nego iglice koje su na tlu. Askospore se najčešće šire anemohorijom.

Voda je potrebna za klijanje konidija. Sheridan i Yen (1970) utvrdili su dobru klijavost između 98% i 100% relativne vlažnosti pri 17 °C, uz ograničeno klijanje kod niže relativne vlažnosti od 76%. Nema klijavosti konidija *D. septosporum* pod niskom relativnom vlažnosti i visokim temperaturama.

Kada je slobodna voda dostupna za klijanje konidija, potrebna je i odgovarajuća temperatura. Utvrđeno je da se klijavost konidija *D. septosporum* pojavljuje na temperaturama između 5 i 30 °C, uz optimalno 18-20 °C (Gibson i sur, 1964; Ivory 1967b, 1972a; Sheridan i Yen, 1970; Gibson, 1972; Karadžić, 1994; Bulman, 2008). Nadalje, klijavost je inhibirana pri temperaturama od 0 do -2 °C, ali spore ne gube vitalnost.

Peterson (1966, 1978) i Walla (1978) utvrdili su klijavost između 12-28 °C uz optimalnu temperaturu za klijanje, 24 °C. Naime, oni su radili u Nebraski prije nego su otkrivene dvije različite vrste *Dothistroma* spp., vjerojatno su pratili *D. pini*, a ne *D. septosporum*. To bi moglo objasniti ove varijabilnosti.

Konidija proizvede od jedne do tri klične cijevi. Jedna klična cijev proizvodi se iz svake stanice konidije (konidije su dvostanične, rjeđe trostanične ili

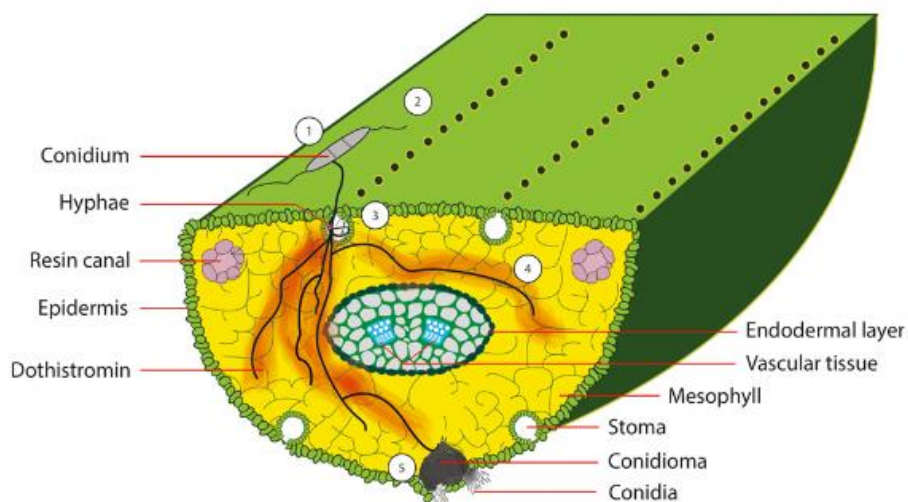
četverostanične). Klične cijevi koje su proizvedene iz vršnih (terminalnih) stanica često se pojavljuju prve i snažnije su od središnjih proizvedenih stanica (Ivory, 1972). Orijentacija klične cijevi nije utjecana topografijom iglica niti postoji geotropična reakcija rasta (Peterson i Walla, 1978).

Postoje izvještaji o tome da je rast usmjeren prema puči ili je to slučajno, iako postoji veća tendencija usmjerena rasta kod prirodnih infekcija nego kod umjetnih inokulacija. Peterson (1969b) i Peterson i Walla (1978), koristeći prirodno zaražene *P. ponderosa* i *P. nigra*, primijetili su jasan pravac rasta klične cijevi prema puči te također izvijestili povremenu klijavost samo na strani konidije koja je bliža puči. Povremeno sekundarne konidije su proizvedene iz micelija na površini iglice. Peterson i Walla (1978) utvrdili su sekundarne konidije nakon nekoliko dana u vrlo vlažnim uvjetima, na vrhuncu razdoblja prirodne infekcije. Kao što je prethodno napisano, vjerojatno su pratili vrstu *Dothistroma pini*.

Nije potvrđeno da svjetlo ima utjecaja na klijavost (Gibson, Christensen i Munga, 1964, Ivory, 1967b). Mnogi autori navode različite raspone pH za klijanje konidija, uz dobru klijavost na pH 3,5 te pH 4-9 (Ivory, 1967b; Ito, Zinno i Suto, 1975). Shishkina i Tsanova (1966b) također su testirali širok raspon pH vrijednosti s najvećom produkcijom micelija pri pH 4,5. Utjecaj pH vrijednosti na klijavost je mala.

3.7.2. Rast micelija gljive

Nakon klijanja spora i razvoja klične cijevi nastanu apresoriji, pet (Ivory, 1972b) do šesnaest (Gadgil, 1967) dana nakon inokulacije kojima se gljiva pričvrsti za površinu biljnoga tkiva. Iz apresorija se razvije infektivna hifa koja preko puči prodire kroz zaštitne stanice i grana se u međustaničnoj šupljini. Nakon ulaska u iglicu septirane hife granaju se u mezofilu, unutar i van stanica. Rast micelija unutar tkiva iglice uzrokuje smrt stanica koje se ispunjavaju sa smolom proizvodeći makroskopske lezije (Ivory, 1972; Peterson i Walla, 1978). Mrtve mezofilne stanice obližnjih koloniziranih područja ukazuju da su stanice domaćina ubijene unaprijed hifama pomoću toksina dotistromina (Gadgil, 1967; Ivory, 1972b; Bradshaw, 2004). Hife su 2-3 μm u promjeru, s pregradama, smeđe, razgranate i obično hijaline (Edwards i Walker, 1978).



Slika 9. Ostvarenje infekcije i razvoj plodnih tijela *Dothistroma* spp. na borovoj iglici; 1. Klijanje konidija, 2. Rast hifa na površini iglice te kroz puči, 3. Kolonizacija šupljine unutar puči hifama, 4. Međustanične hife koloniziraju mezofil uz proizvodnju dotistromina koji ubija mezofilne stanice ispred rastuće hife, 5. Acervuli s konidijama

([http://www.fabnet.up.ac.za/publication/pdfs/2218-fraser et al 2015 resistance mechanisms doth-pinus interaction.pdf](http://www.fabnet.up.ac.za/publication/pdfs/2218-fraser_et_al_2015_resistance_mechanisms_doth-pinus_interaction.pdf))

Rast micelija može se nastaviti tijekom širokog raspona uvjeta. Primjerice Ivory (1967b) navodi da u kulturi micelij raste na 6-28 °C i uz pH između 2 i 7, uz optimalno na 13 °C i pH 3,5. Karadžić (1994) je zabilježio optimalan rast na 20 °C (min. 3 °C, max. 29 °C). Barnes, Crous, Wingfield i ostali (2004) također su zabilježili najveći rast na 20 °C, dok rast micelija nije zabilježen na 30 °C. Ito, Zinno i Suto (1975) primijetili su rast od 3°C do 30 °C, bez rasta na 35 °C te ponovno s optimalnom temperaturom od 20 °C. Rast gljive spor je općenito pri svim uvjetima, na 20°C micelij u prosjeku naraste 1.5-2 mm tjedno, za rast nisu potrebne nikakve posebne hranjive tvari osim izvora ugljika i dušika (Ivory, 1967b) .

3.8. Čimbenici koji utječu na infekciju

Kako je za infekciju potrebno klijanje konidija, pretpostavlja se da okolišni uvjeti koji pogoduju klijanju konidija također su povoljni i za infekcije. *D. septosporum* prilagođena je toplim, vlažnim sredinama bez velikih temperaturnih razlika. Točnije, optimum za infekcije borova je između 16 i 20°C pod uvjetom da su iglice stalno vlažne (više od 10 sati) (Gadgil, 1974; Gilmour, 1981). Istraživanja u kontroliranim uvjetima pokazala su da se infekcija može pojaviti pri temperaturama nižim od 4,4°C. U uvjetima na terenu, minimalna temperatura za infekciju je oko 7°C.

Infekcija domaćina *D. septosporum* i stupanj težine bolesti ovisi o svjetlu. Infekcija se ne javlja u nedostatku svjetla, a intenzitet bolesti se linearno povećava s povećanjem intenziteta svjetlosti (Ridley i Dick, 2001). Istraživanja su pokazala da se utjecaj svjetlosti odnosi na domaćina, a ne na patogena (svjetlost nema utjecaja na klijanje konidija ili na rast *D. septosporum* na površini iglica).

Osim pogodnih uvjeta, posebice temperature i vlage, visoke razine inokuluma također su važan faktor potreban za ostvarenje infekcije (Bulman i sur., 2004). Proizvodnja inokuluma je upravljana poglavito temperaturom. Tople temperature utječu na razvoj acervula osobito u proljeće na prošlogodišnjim i starijim iglicama.

Kod nekih vrsta drveća s povećanjem dobi povećava se i otpornost na patogenu gljivu, kao npr. kod vrste *P. radiata*, dok stabla svih uzrasta vrsta *P. nigra* i *P. sylvestris* mogu biti zaražena patogenom.

Najviši intenziteti bolesti na *P. radiata* u Australiji dogodili su se na siromašnim tlima. Infekcije su također teže u sastojinama tretiranim visokim razinama dušikova gnojiva (Lambert, 1986), kao što je prethodno već i opisano.

3.9. Mogućnost širenja *Dothistroma* spp. u nova područja

Prema važećim propisima EU-a, identificirana su četiri moguća ulaska *D. septosporum* i *D. pini* iz napadnutih okolnih zemalja u Europsku uniju:

1) Biljke domaćini namijenjeni sadnji / presađivanju (sadnice, ukorijenjena božićna drvca, bonsai biljke, itd.), isključujući plodove i sjeme, podrijetlom iz zaraženih zemalja mogu nositi *D. septosporum* i *D. pini* u obliku latentnih micelija i / ili konidija / askospora, koje su sposobne preživjeti uvjete transporta / skladištenja i postojeće procedure upravljanja štetočinama. Zbog svoje krajnje uporabe (sadnja / cijepljenje) ovaj biljni materijal će biti široko distribuiran u rasadnicima četinjača, privatnim i javnim vrtovima, drvoredima kraj cesta, itd. Iz biljnog materijala, patogeni se mogu prenijeti prirodnim putem i uz ljudsku pomoć. Širenje uz ljudsku pomoć uključuje: premještanje / trgovinu zaraženog biljnog materijala namijenjenog za sadnju / cijepljenje, širenje na šumarskom alatu, vozilima, cipelama, itd.

2) Prirodna sredstva (vjetar, kiša, magla, oblaci, itd.)

U vlažnim uvjetima, konidije *Dothistroma* spp. oslobađaju se iz acervula u obliku oblaka i rasprše se unutar ili između krošanja stabala domaćina od 50-100 m od izvora inokuluma, neke konidije mogu biti raspršene preko veće udaljenosti zračnom strujom konidija te oblacima i gustom maglom (300 m), Gibson i sur. (1964) sugeriraju da se konidije mogu transportirati možda i do 160 km. U slučaju *D. septosporum*, širenje patogena na veće udaljenosti može doći od strane askospora, koje se također otpuštaju iz askusa za vrijeme kiše, rose ili magle te se šire zračnim strujama na velike udaljenosti.

3) Biljke domaćini i biljni dijelovi s iglicama koje nisu namijenjene za sadnju (npr. svježe grane, posječena božićna drvca i sl.)

4) Zaražene iglice transportirane na proizvodima od biljaka domaćina (npr. plodovi, sjemenke, trupci i kora) te strojevima, vozilima, obucom i sl.

Od navedena četiri moguća načina širenja patogena *D. septosporum* i *D. pini* na područje EU, prva tri se smatraju najvažnijim. Postoje pojedine mjere koje omogućuju sprječavanje širenja bolesti između zemalja, a uključuju fitosanitarni certifikat, uporabu karantena, pregled pošiljke te ispitivanje pošiljke.

3.10. Posljedice infekcija patogenih gljiva *Dothistroma* spp.

D. septosporum uzrokuje nekrozu iglica i prijevremeno osipanje, smanjenje visinskog i debljinskog prirasta stabla, a jače i kronično oboljeli borovi osuše se nakon nekoliko godina trajanja bolesti. *D. pini* vjerojatno ima slične posljedice na svojim domaćinima, iako još uvijek nisu utvrđene. Općenito, posljedice *Dothistroma* spp. ovise o nekoliko čimbenika; osjetljivosti domaćina, starosti domaćina, uvjetima okoline (npr. klima, uzgojni postupci) te intenzitetu bolesti. Nekroza iglica dovodi do gubitka u prinosu zbog smanjene sposobnosti fotosinteze biljaka. Što se tiče starosti domaćina, sve iglice na mladim stablima imaju istu fotosintetsku sposobnost tako da svaka infekcija krošnje utječe na prirast (naročito je oštećen visinski prirast). Na starijim stablima početne posljedice bolesti su male obzirom da bolest ima tendenciju da prvo zarazi starije, manje fotosintetski aktivne iglice, a kako se razina bolesti povećava i mlađe iglice bivaju zaražene, dogode se veći gubici u prinosu (naročito je oštećen debljinski prirast). Van der Pas (1981) ističe proporcionalnost između intenziteta bolesti (postotak zaraženih iglica) i gubitka volumena, na primjer, intenzitet bolesti 50% rezultirao je gubitkom volumena od 50% nakon tri godine, Old i Dudziński (1999) utvrdili su sličan odnos, iznad 25% otpalih iglica, svaki dodatni gubitak od 1% slijedi 1% gubitka volumena i do 75% gubitka iglica.

Najvažnije posljedice uključuju gubitak drvene mase i odumiranje stabala. Brown i Clayden (2012) iznose da su prosječne stope odumiranja u Velikoj Britaniji 6% godišnje u sastojinama vrste *P. nigra* ssp. *laricio* i 20% u zrelim sastojinama *P. contorta* var. *latifolia* koje nisu orezivane. Taylor i Schwandt (1998) izvijestili su da je i do 40 % mortaliteta u sastojinama vrste *P. flexilis* u Montani (SAD), a Parker i Collis (1966) 60% smrtnosti u sastojinama vrste *P. radiata* nakon više od tri godine infekcije u Kanadi.

Neizravni učinci patogena mogu uključivati povećanu osjetljivost na sekundarne štetnike i patogene. Na primjer, 1967. Etheridge je potvrdio da stabla s ozbiljnom defolijacijom od strane gljive *Dothistroma septosporum* su osjetljivije na

Armillaria spp. i druge patogene, što je rezultiralo povećanjem smrtnosti u jako zaraženim sastojinama na Novom Zelandu i u istočnoj Africi. Stres domaćina zbog teške defolijacije i odumiranja također može dovesti do povećanja populacije insekata (tj. potkornjaka) koji se hrane i razmnožavaju na mrtvim i umirućim sastojinama. Preuranjeno osipanje iglica može utjecati na zalihe hrane i na gnijezda autohtonih životinjskih vrsta.

U slučaju izbijanja bolesti, najučinkovitija mjera za kontrolu gljive je uklanjanje i uništavanje zaraženih stabla kako bi se smanjilo širenje i intenzitet bolesti. Dakle, ovisno o intenzitetu smrtnosti i / ili veličini uklanjanja zaraženih stabala, bolest može dovesti do gubitka izvornih šuma četinjača, a time i genetskih resursa.

D. septosporum i *D. pini* proizvode toksin, dotistromin, koji se pokazao otrovan i može oštetiti ili uništiti stanice biljaka, algi, bakterija ili životinja (Harvey i sur., 1976; Stoessl i sur., 1990; Jones i sur., 1995). Mogući učinci nakupljanja dotistromina u mikroflori i fauni koje nastanjuju šumu, zbog obilnih odbačenih zaraženih borovih iglica, nisu poznati. Štoviše, dotistromin se također pokazao da je mutagen i klastogen, iako ne postoje dokazi da je kancerogen (Ferguson i sur., 1986). Količine dotistromina iz okoliša su niže od onih koje uzrokuju mutagenost ili toksičnost, no učinci dugotrajnog izlaganja ljudi na niskim razinama dotistromina su nepoznati (Elliot i sur., 1989; Bulman sur., 2008).

Osim toga, kod uporabe fungicida na bazi bakra radi kontrole *Dothistroma* spp., dolazi do akumulacija bakra u tlu, rijekama, jezerima, itd. što može imati negativan utjecaj na biljni i životinjski svijet.

4. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA

4.1. Područje rada

Istraživanje intenziteta pojave *Dothistroma* spp. provedeno je tijekom 2015. i 2016. godine na lokaciji Novaki Pazinski. Novaki Pazinski, naselje je 4 km sjeveroistočno od Pazina te pripada općini Cerovlje u Istarskoj županiji. Istarska županija smještena je na krajnjem zapadu Republike Hrvatske. Obuhvaća veći dio najvećeg jadranskog poluotoka koji se nalazi na sjeverozapadnom dijelu Jadranskog mora.



Slika 10. Položaj Istre na karti Republike Hrvatske te položaj grada Pazina (Novaki Pazinski)

(<http://www.dinarskogorje.com/karte---besplatne-online.html>;

<http://www.maphill.com/croatia/istra/maps/satellite-map/>)

Istra se dijeli na tri dijela: Crvena Istra (zapadna obala), Siva Istra (flišno područje središnje Istre) te Bijela Istra (padine Učke i istočni dio poluotoka). Područje istraživanja Novaki Pazinski nalazi se na području Sive Istre s izrazitim brežuljcima koji su u sjevernim dijelovima često prožeti vodotocima. Na ovom dijelu prevladavaju lapori, pješčenjaci i mekši vapnenci. Podložni su trošenju, ima više silikata i nema krških pojava. Uglavnom su mlađa tla koja su plitka, suha i vrlo podložna trošenju pa su neprestance u stvaranju. Rastresiti dio fliša može biti dublji ili plići, a obzirom na udio pješčenjaka i lapora manje ili više skeletan. Na takvoj podlozi nastaje slabo plodan silikatno-karbonatni sirozem i nešto plodnija karbonatna rendzina, koji ispiranjem karbonata postupno prelaze u smeđa tla. Područje karakteriziraju i

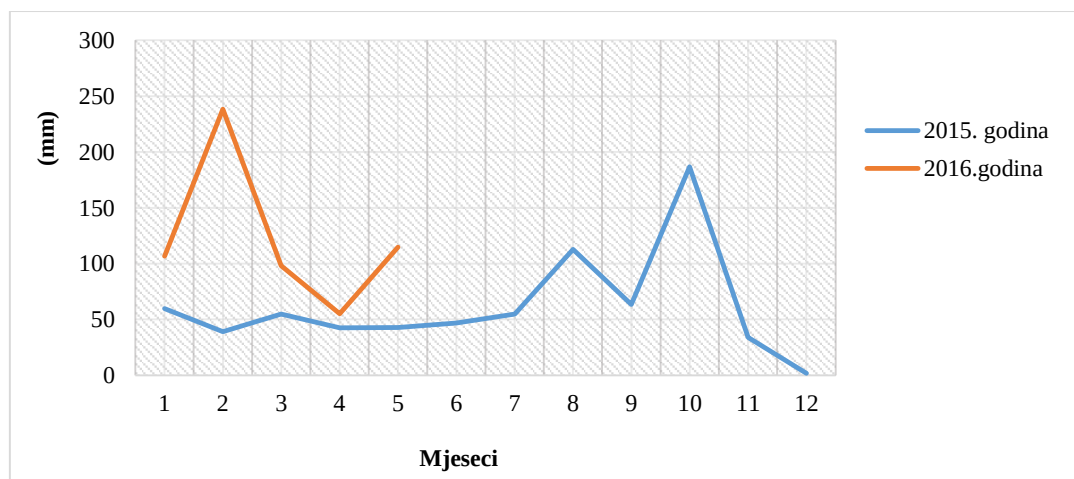
erozivne pojave (plosnata, brazdasta i jaružna erozija) kao posljedica reljefa, nepropusnog matičnog supstrata, oborina i djelovanja čovjeka, posebice poljoprivredom i deforestacijom.



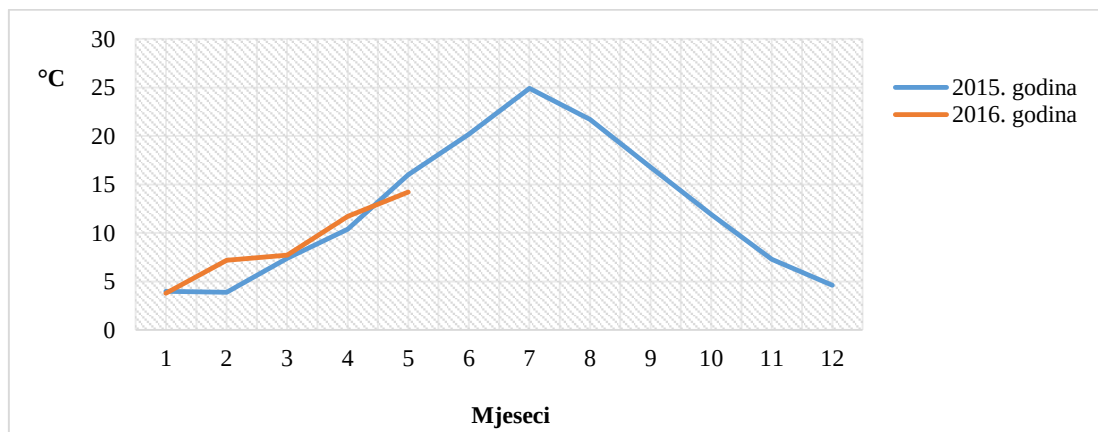
Slika 11. Crvena Istra, Siva Istra te Bijela Istra (<http://istra.lzmk.hr/clanak.aspx?id=957>) uz izgled flišnog područja središnje Istre na lokaciji Novaki Pazinski (Milotić, 2015)

Područje grada Pazina obilježeno je gotovo kontinentalnom klimom. Kao i cijeli istarski poluotok prevladava makroklimatski tip "Cfsax". Karakteristike toga tipa su umjereno topla kišna klima s vrućim ljetima. Padaline su ravnomjerno zastupljene tijekom cijele godine. Najsušniji dio godine izražen je ljeti. Količina padalina prati reljefnu strukturu te raste u smjeru prema Učki. U nastavku su prikazani podaci Državnog hrvatskog meteorološkog zavoda (DHMZ) za meteorološku postaju Pazin 2015. i 2016. godine u vrijeme provođenja istraživanja *Dothistroma* spp.

Graf 1. Srednja mjesečna količina oborina za meteorološku postaju Pazin



Graf 2. Srednja mjesečna temperatura zraka za meteorološku postaju Pazin



Tablica 2. Srednje maksimalne temperature zraka za meteorološku postaju Pazin (2015)

PAZIN - Srednje maksimalne temperature zraka(°C)												
Mjeseci	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.	VII.	VIII.	IX.	X.	XI.	XII.
2015.	9,8	10,2	13,8	17,3	22,8	27,9	33,0	30,5	23,9	18,4	15,3	11,7
Apsolutni	13,1	15,1	17,9	23,8	27,5	32,5	38,1	36,6	31,3	22,8	25,1	16,5
Datum	18.sij	11.vlj	30.ožu	22.tra	18.svi	6.lip	22.srp	13.kol	18.ruj	5.lis	8.stu	2.pro

Tablica 3. Srednje minimalne temperature zraka za meteorološku postaju Pazin (2015)

PAZIN - Srednje minimalne temperature zraka(°C)												
Mjeseci	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.	VII.	VIII.	IX.	X.	XI.	XII.
2015.	-1,2	-1,1	1,8	3,9	10,3	12,7	16,7	15,1	11,6	7,3	1,7	-0,1
Apsolutni	-9,6	-8,2	-3,9	-3,1	5,5	7,5	12,0	9,5	4,4	0,7	-7,0	-8,5
Datum	1.sij	19.vlj	1.ožu	2.tra	29.svi	21.lip	11.srp	23.kol	22.ruj	24.lis	25.stu	31.pro

Tablica 4. Srednje maksimalne temeprature zraka za meteorološku postaju Pazin (2016)

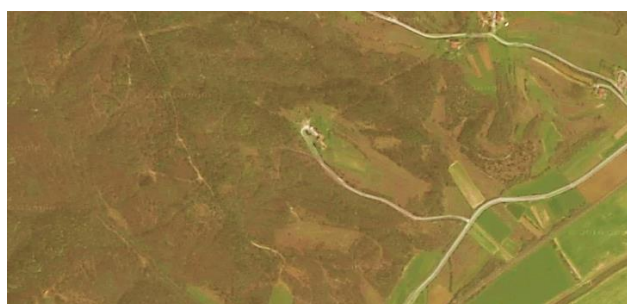
PAZIN - Srednje maksimalne temperature zraka(°C)					
Mjeseci	I.	II.	III.	IV.	V.
2016.	9,2	11,5	13,4	18,7	21,1
Apsolutni	14,5	14,7	18,7	23,7	27,7
Datum	11.sij	29.vlj	19.ožu	5.tra	27.svi

Tablica 5. Srednje minimalne temperature zraka za meteorološku postaju Pazin (2016)

PAZIN - Srednje minimalne temperature zraka(°C)					
Mjeseci	I.	II.	III.	IV.	V.
2016.	-0,8	3,5	3,3	6,4	8,7
Apsolutni	-9,7	-4,5	-2,7	-0,3	2,8
Datum	19.sij	5.vlj	15.ožu	26.tra	18.svi

Šume na području grada Pazina svrstavaju se u šume na kršu (degradirane šume s izraženim općekorisnim funkcijama na području visokoga krša i šume primorskoga krša). Prema namjeni to su zaštitne šume koje prvenstveno služe za zaštitu zemljišta, voda, naselja, objekata i druge imovine, a nije naglašena njihova gospodarska funkcija. Šumske površine nalaze se pretežno u submediteranskoj zoni. Ponegdje se fragmentarno javljaju i elementi koji pripadaju euromediteranskoj zoni i to uglavnom na prisojnim stranama izloženim suncu. Od ukupne površine državnih šuma u Istri na četinjače otpada 5 777 ha. Drvna zaliha istarskih četinjača veća je od 670 000m³, najzastupljeniji je crni bor s 316 000 m³.

Uzorci iglica s karakterističnim simptomima *Dothistroma* spp. sakupljali su se nasumično u kulturama crnoga bora (*Pinus nigra* Arnold.) nastalih pošumljavanjem degradiranih područja Istre. Umjetne sastojine imaju zadaću melioracije staništa i stvaranja uvjeta za prirodnu sukcesiju autohotnih vrsta. Uzorci su u oba navrata sakupljanja (jesen 2015. i proljeće 2016.) uzeti na lokaciji sa sjevernom geografskom širinom 45 °15 '28.7604 " i istočnom geografskom dužinom 13 °59' 0.996" (263 m n.v.)



Slika 12. Područje rada Novaki Pazinski
(<https://www.google.hr/maps/place/Novaki+Pazinski/>)

4.2. Sakupljanje i analiza uzoraka

Istraživanja su obavljena na lokaciji Novaki Pazinski u kulturama crnoga bora (*Pinus nigra* Arnold.) različite dobne strukture i odvijala su se u dvije faze; najprije na terenu gdje su se sakupljali uzorci s karakterističnim simptomima, a zatim je analiza uzoraka izvršena u Laboratoriju za patologiju drveća na Šumarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

- Pregled stabala i sakupljanje uzoraka na terenu

Gljivična bolest uzrokovana *Dothistroma* spp. istraživana je tijekom 2015. i 2016. godine, a skupljanje uzoraka obavljeno je 31. rujna 2015. te 29. svibnja 2016. godine. Terenski dio istraživanja obuhvaćao je obilazak borovih kultura, vizualno određivanje zdravstvenoga stanja te sakupljanje uzoraka biljnog materijala sa simptomima bolesti. Broj uzoraka za laboratorijsku analizu varirao je ovisno o zdravstvenom stanju pojedinog bora.

Uzorci su se odlagali u plastične vrećice s etiketom koja je sadržavala lokaciju sakupljanja borovih iglica i datum / godinu sabiranja. Uzorke je bilo potrebno dolaskom u Laboratorij za patologiju drveća staviti u papirnate vrećice i čuvati na sobnoj temperaturi kako bi se održali za daljnju uporabu.

- Analiza uzoraka u Laboratoriju za patologiju drveća na Šumarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

Prva analiza biljnog materijala, borovih iglica, obavljala se stereomikroskopom s povećanjem 7,5 do 50x kako bi se utvrdila patogena gljiva. Izabrano je 200 iglica s karakterističnim simptomima koje su se potom stavile na vlaženje u Petrijeve zdjelice promjera 12 cm radi bubrenja i dozrijevanja prisutnih plodnih tijela gljive. U Petrijeve zdjelice stavljao se filter papir koji se umjereno prskao destiliranom vodom. Borove iglice u Petrijevim zdjelicama vlažile su se 1-2 dana na sobnoj temperaturi nakon čega su bile spremne za daljnju analizu.

1) Određivanje broja plodišta *Dothistroma* spp.

Određivanje zrelosti plodnih tijela *Dothistroma* spp.

Determinacija prisutstva drugih gljivičkih patogena na borovim iglicama

Nakon vlaženja iglica ponovno se pristupilo analizi uzoraka pod stereomikroskopom. Uzorak je obuhvaćao 100 borovih iglica sakupljenih u jesen 2015. i 100 borovih iglica sakupljenih u proljeće 2016. godine. Svaka pojedina iglica se promatrala pod stereolupom s ciljem determiniranja plodnih tijela gljive *Dothistroma* spp. te bilježenja broja plodišta u Excel tablici. Plodišta su svrstavana u kategorije obzirom na njihov stadij razvijenosti, na nerazvijena, polurazvijena, razvijena i prazna te na temelju vizualne procjene bilježilo se prisustvo istih. Isto tako, tijekom promatranja bilježilo se i prisustvo drugih patogena borovih iglica: *Sphaeropsis sapinea*, *Cyclaneusma niveum*, *Truncatella hartigii* te *Lophodermium pinastri*. Podaci koji prikazuju broj plodišta kao i broj plodišta obzirom na kategorije razvijenosti obrađeni su programskim paketom StaSoft. Inc. (2011) STATISTICA version 10.

Kod determiniranja vrsta patogenih gljiva pristupalo se izradi mikroskopskih preparata što tanjih poprečnih prereza iglice s prisutnim plodištem patogene gljive. Važno je napomenuti da prilikom svakog novog rada na iglici, pribor koji se koristi mora biti steriliziran (70% etanol). Ovako pripremljeni preparati analizirali su se svjetlosnim mikroskopom na uvećanju od 100, 200 ili 400x te se na temelju oblika plodišta i morfologije spora vrlo lako determinirala vrsta patogene gljive. Kod determinacije patogene gljive koristila se i stručna literatura.

2) Tehnike izolacije patogena

Prije provođenja tehnika izolacije patogena potrebno je pripremiti hranjivu podlogu za izolaciju i rast gljiva *Dothistroma* spp. Koriste se različite hranjive podloge, najčešće su MA (Malt Agar), MEA (Malt Extract Agar), DM (Dothistroma medium), DSM (Dothistroma sporulating medium), WA (water agar), PNA (pine needle Agar), PMMG (pine needle minimal medium with) te PDA (potato dextrose agar). Mogu se izraditi sa ili bez antibiotika. Najčešće korišteni antibiotik je streptomycin. Za početnu izolaciju preporučuje se izrada hranjivih podloga od MA, MEA, DM i PNA uz dodatak streptomicina s ciljem smanjenja bakterija i ostalih

nečistoća. Jednom kada se dobiju čiste kulture, antibiotici u hranjivim podlogama nisu potrebni.

U ovome istraživanju koristile su se PDA (Potato dextrose agar) i MEA (Malt extract agar) hranjive podloge. Najprije se izvagala masa kupovnog i već priremljenog praha prema uputama na ambalaži (PDA – potato dextrose agar 39g/1l; MEA-50g gotovog praška u 1000ml destilirane vode). U Erlenmayerovu tikvicu ulila se 1 litra destilirane vode i umetnuo magnet (vodu je prije toga moguće zagrijati u kuhalu kako bi se prah što prije otopio). Zatim se u tikvicu s vodom dodala odvagana masa praha koja se potom stavila na magnetsku mješalicu, namjestio se broj okretaja (vrtnju) na 700 u minuti i temperatura na 250 °C. Pričekalo se da se prah potpuno otopi, odnosno da otopina proključa (zapjeni se). Otopina se sterilizirala u prijenosnom parnom sterilizatoru prema uputama na ambalaži (15 minuta na 121 °C ili 10 min na 115 °C). Kad se hranjiva podloga ohladila na približno 50 – 55 °C, dodano je 20 ml 1%-tne otopine (1 g antibiotika na 100 ml vode) antibiotika streptomicina u 1 litru hranjive podloge.

Prije početka rada potrebno je sterilizirati sav laboratorijski pribor koji će biti potreban pri izradi izolata.

Laboratorijski pribor sterilizirao se u alkoholu (70% etanol) nakon čega se izložio nekoliko sekundi plamenu vatre iz plamenika kako bi alkohol brzo ispario. Noževe skalpela ne treba zagrijavati pretjerano jer se time otupljuje oštrica. Pri korištenju na iglicama oštrice moraju biti potpuno ohlađene kako se ne bi uništile konidije. Instrumente je potrebno sterilizirati između svakog novog uzimanja uzorka, a radni prostor održavati čistim nanošenjem alkohola (70% etanol).

Nakon sterilizacije laboratorijskog pribora i radne površine potrebna je i sterilizacija borovih iglica. Površina iglice sterilizirala se blagim brisanjem iglice s papirnatim ubrusom prethodno natopljenim alkoholom (70% etanol). U slučajevima kada je iglica relativno čista površinska sterilizacija nije potrebna. Iglica se može i zastrugati oštricom skalpela, no to je veoma osjetljiv zahvat i obavezno ga je činiti pod stereolupom kako se ne bi uništila plodna tijela. Pretjerano jaka sterilizacija iglica omogućuje da sterilant prodre u acervule i uništi spore.

Kada su odrađene sve potrebne pripreme radi sprječavanja kontaminacije izolata, slijede tehnike izolacije. Koristile su se dvije tehnike izolacije.

a) Tehnika izolacije kotrljanjem acervula po hranjivoj podlozi

Na stražnjem dijelu Petrijeve zdjelice promjera 9 cm s hranjivom podlogom MEA ili PDA markerom su se iscrtale dvije do tri paralelne linije. Linije pomažu kod kotrljanja acervula. Na rubu Petrijevih zdjelica ispisale su se informacije o izolatu, datum i godina kotrljanja acervula te lokacija uzorka, u ovom slučaju Novaki Pazinski. Koristeći stereomikroskop iz borove iglice izvadio se jedan acervul pomoću steriliziranog skalpela, pincete ili laboratorijske igle, pri čemu se pazilo da nije uključen bilo koji drugi biljni materijal, kao npr. epiderma. Nakon što se uspješno izvadio acervul stavio se na medij na kraj jedne od linija. Postavilo se onoliko acervula u Petrijevoj zdjelici koliko je iscrtanih linija. Stavljeni acervuli apsorbirali su vlagu s agara što olakšava otpuštanje spora. Pod stereomikroskopom vrhom skalpela ili iglom, acervul se lagano kotrljao niz medij prateći prethodno iscrtane linije na stražnjoj strani Petrijeve zdjelice. Kotrljanjem acervula na površini agara vidljive su oslobođene hijaline, cilindrične i tanke spore. Ideja ove tehnike je da se većina kontaminiranog biljnog materijala i drugih krhotina zadržava na početnom dijelu linije, a čiste spore više se zadržavaju pri kraju iscrtane linije. Između svakog kotrljanja acervula koristile su se tehnike sterilizacije alata i radne površine.

Nakon inkubacijskog perioda 1-2 tjedna na sobnoj temperaturi (20 °C) pri dnevnom svjetlu u zatvorenim posudama kretalo se u proučavanje izolata. Izolati su se proučavali u laminarnom mikrobiološkom kabinetu za rad u atmosferi čistog zraka (takozvanoj besprašnoj komori). Micelij *Dothistroma* spp. u ranoj fazi se može prepoznati po hifama koje rastu u cik-cak linijama, a kasnije po karakterističnoj stromatičnoj morfologiji. Sterilnom iglom ili skalpelom izrezale su se kockice agara veličine 2-3 mm³ zajedno s hifama, odnosno micelijem. Dijelovi izrezanog agara s micelijem stavili su se naopako u sredinu čiste Petrijeve zdjelice (promjera 9 cm), čime se izvršila presađnja patogene gljive i dobivanje čiste kulture. Pratio se daljnji razvoj gljive, koja se inkubirala na sobnoj temperaturi (20 °C) pri dnevnom svjetlu u zatvorenim prozirnim plastičnim posudama.

b) Tehnika izolacije premazivanjem hranjive podloge otopinom spora

Najprije se površina iglice sterilizirala blagim brisanjem papirnatim ubrusom prethodno natopljenim 70% etanolom te se obavila sterilizacija površine čistog predmetnog stakalca. Na čisto predmetno stakalce kapnula se kapljica sterilne destilirane vode. Korištenjem stereomikroskopa iz borove iglice izvadio se jedan acervul pomoću steriliziranog skalpela, pincete ili laboratorijske igle. Za jednostavnije vađenje acervula preporuča se vrh steriliziranog skalpela, pincete ili laboratorijske igle umočiti u sterilnu destiliranu vodu. Izvađeni acervul odložio se na predmetno stakalce s kapljicom sterilne destilirane vode i poklopio pokrovnim stakalcem. Tako pripremljen preparat promatran je pod svjetlosnim mikroskopom kako bi se potvrdilo prisustvo *Dothistroma* spp. konidija. Nakon što se potvrdilo prisustvo *Dothistroma* spp. konidija na preparatu, pokrovno stakalce se odstranilo pomoću pincete. U ovom trenutku može se dodati kap ili dvije sterilne destilirane vode. Pomoću sterilne eze s predmetnog stakalca pokupila se suspenzija konidija i nanijela u linijama u Petrijevu zdjelicu (9 cm) s hranjivom podlogom MEA ili PDA koja sadrži antibiotik streptomycin (10 ml 1% vodene otopine antibiotika na 1 l hranjive podloge). Može se nanijeti četiri do šest paralelnih linija. Postupak se ponavljao sve dok više nije bilo tekućine na predmetnom stakalcu. Na Petrijeve zdjelice napisao se datum i godina izolacije te lokacija uzimanja uzoraka. Između svakog novog nanošenja suspenzije spora koristile su se sterilne tehnike, po potrebi i korištenjem plamenika.

Petrijeve zdjelice inkubirale su se na 20 °C (17-22 °C) tijekom četiri do devet dana u zatvorenoj posudi. Izolati su se proučavali u laminarnom mikrobiološkom kabinetu. Miceliji koji su morfološki odgovarali karakteristikama *Dothistroma* spp. presadili su se u čiste kulture. Pratio se daljnji razvoj gljive, koja se inkubirala na sobnoj temperaturi (20 °C) pri dnevnom svjetlu u zatvorenim prozirnim plastičnim posudama. Kartonske kutije potrebno je izbjegavati zbog mogućnosti prisustva insekata ili grinja.

Zbog sporog rasta *Dothistroma* spp. kultura i prisustva endofitskih gljiva u iglicama bora, izolacija nije uvijek uspješna. Druge gljive ili bakterije prisutne na iglicama mogu brzo rasti te prekriti moguće kolonije patogena.

U istraživanju je korišteno pet izolata dobivenih iz jesenskih iglica te pet izolata dobivenih iz proljetnih iglica.

3) Određivanje morfologije spora (boja, oblik, veličina) te brzine rasta izolata na hranjivim podlogama

Nakon što su se razvile kulture *Dothistroma* spp. na agaru, obavila se analiza spora. Koristeći sterilni laboratorijski alat, iglu ili skalpel struganjem površine micelija gljive u Petrijevim zdjelicama napravio se nativni preparat.

Ovaj dio posla radi se obavezno u laminarnom mikrobiološkom kabinetu kako ne bi došlo do kontaminacije. Komadić micelija sa sporama ili acervula s iglice se stavio u kapljicu destilirane vode na predmetno stakalce, poklopio pokrovnicom i nativni preparat je bio spreman za mikroskopiranje. Fotografska digitalna kamera Motic, Moticam pro 252A koja je instalirana na mikroskop Olympus (model BX41) potrebna je kod dobivanja fotografija spora na temelju kojih su se izmjerile dužine i širine 100 konidija. Isto tako mikroskopiranjem se potvrdila vrsta gljive na temelju oblika i boje konidija.

Rast micelija praćen je na pet izolata dobivenih iz jesenskih iglica te pet izolata dobivenih iz proljetnih iglica. Svaka dva tjedna mjerio se raspon novonaraslog micelija s točnošću na 0,5 mm u 4 međusobno nasuprotna smjera (gore, dolje, lijevo, desno). Rast se računao kao prosječna razlika između izmjerenih raspona.

5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

5.1. Pregled stabala i sakupljanje uzoraka na terenu

Pregledom kultura crnoga bora 31. rujna 2015. godine na lokaciji Novaki Pazinski vizualnom procjenom ustanovilo se da su pojedina stabla od nekoliko godina potpuno suha, na srednjedobnim i starijim stablima bili su vidljivi osuti dijelovi izbojaka, grana i dijelova krošanja s karakterističnim izbojcima nalik „lavljem repu“ što je rezultat kroničnog karaktera ove bolesti. Starije iglice uglavnom su zaražene prve pa simptomi bolesti najprije se vide u bazi krošnje. Opaženo je prisustvo ranih simptoma na mjestu infekcije koji se javljaju nakon inkubacijskog razdoblja (1-4 mjeseci), a uključuju male klorotične žute ili žutosmeđe trake ili pjege koje se s vremenom pretvore u smeđe, crvenkasto-smeđe prstenove 1-2 mm širine. Prisutne su bile i iglice koje sadrže smeđi, gornji (mrtvi) i zeleni, donji (živi) dio te potpuno suhe iglice. Najčešći simptomi oboljenja bili su prisutni na jednogodišnjim iglicama, na pojedinim stablima primijećeni su i na iglicama iz tekuće vegetacije, a dvogodišnje iglice u potpunosti su bile osute. Plodna tijela gljive nisu se primjećivala golim okom, mjestimično ispod epiderme zabilježen je početni izgled nastanka plodišta u obliku crne točke.



Slika 13. Zamijećeni karakteristični simptomi *Dothistroma* spp. na lokaciji Novaki Pazinski u jesen (Milotić, 2015)

Pregledom kultura crnoga bora 29. svibnja 2016. godine na lokaciji Novaki Pazinski vizualnom procjenom ustanovila se izrazita prorijeđenost krošanja srednjedobnih i starijih stabala, bili su vidljivi osuti dijelovi izbojaka, grana i dijelova krošanja s karakterističnim izbojcima nalik „lavljem repu“, grane stabala u bazi krošanja potpuno su bile osušene. Opaženo je prisustvo karakterističnih smeđih, crvenkasto-smeđih jako izraženih prstenova promjera 1-2 mm. Prisutne su bile i iglice koje sadrže smeđi, gornji (mrtvi) i zeleni, donji (živi) dio te potpuno suhe iglice. Simptomi oboljenja bili su prisutni na jednogodišnjim iglicama, a dvogodišnje iglice u potpunosti su bile osute. Plodnih tijela gljive, acervula, bilo je mnoštvo te su primijećena i golim okom.



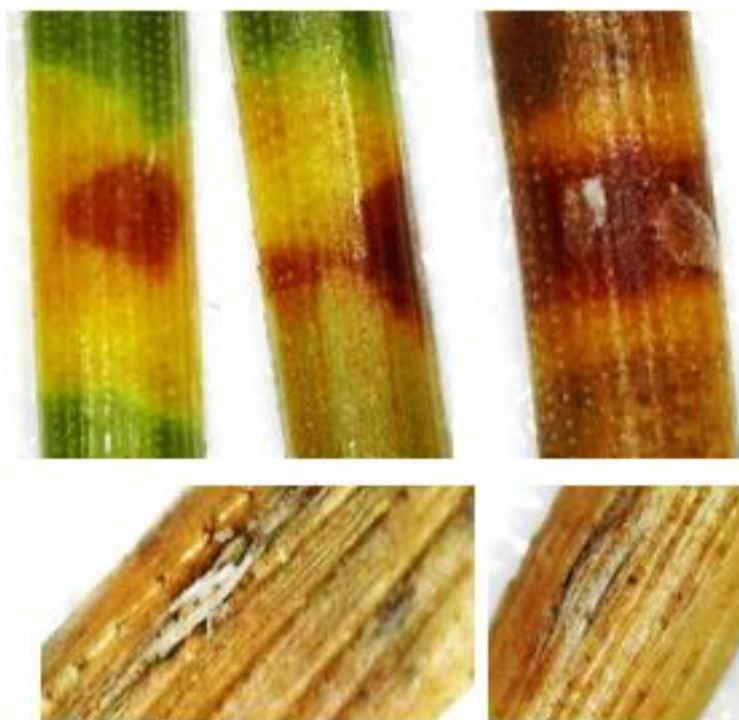
Slika 14. Zamijećeni karakteristični simptomi *Dothistroma* spp. na lokaciji Novaki Pazinski u proljeće (Milotić, 2015)

Na temelju navadenih vizualnih simptoma utvrdila se prisutnost *Dothistroma* spp.

5.2. Analiza uzoraka u Laboratoriju za patologiju drveća na Šumarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

5.2.1. Simptomi na iglicama *Pinus nigra* Arnold

Na uzorku od 100 iglica u jesen (31. rujan) sakupljenih na lokaciji Novaki Pazinski okularnim pregledom ustanovile su se žutosmeđe trake ili pjege te smeđi, crvenkasto-smeđi prstenovi.



Slika 15. Žutosmeđe trake ili pjege te smeđi, crvenkasto-smeđi prstenovi uz prisustvo plodnih tijela (Milošić, 2015)

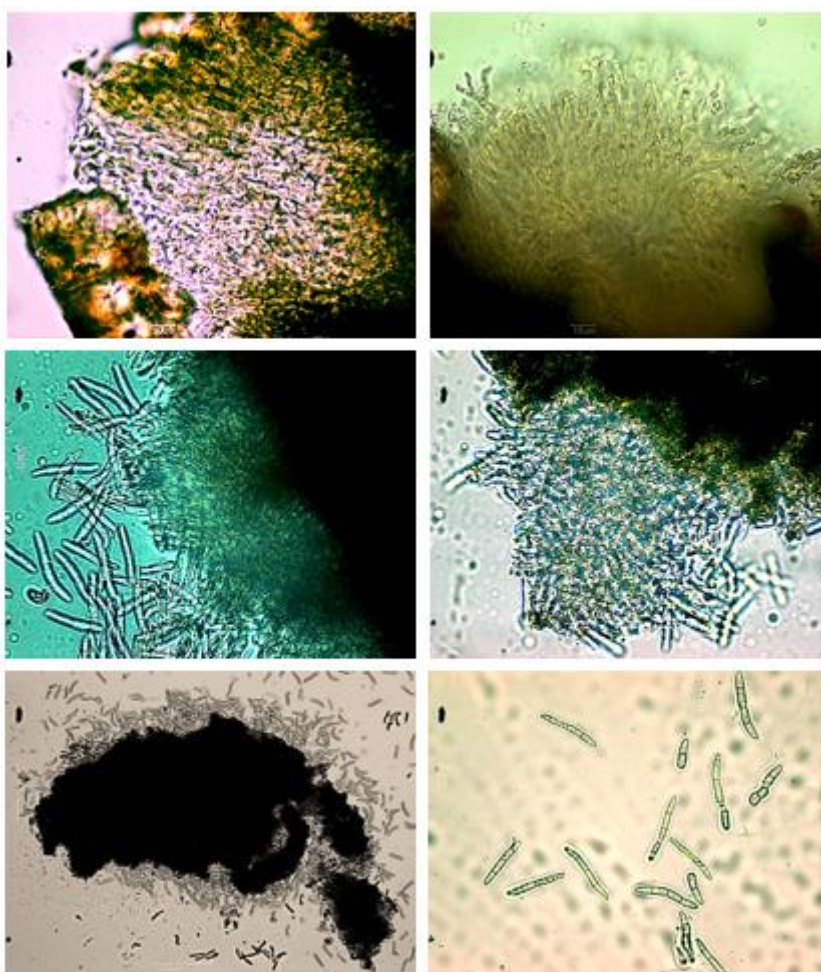
Na uzorku 100 iglica u proljeće (29. svibanj) sakupljenih na lokaciji Novaki Pazinski okularnim pregledom ustanovili su se crvenkasto-smeđi prstenovi, iglice su bile suhe s mnoštvom plodnih tijela.



Slika 16. Crvenkasto-smeđi prstenovi s mnoštvom plodnih tijela acervula (Kranjec, 2016, Milošić, 2016)

5.2.2. Determinacija patogenih gljiva na iglicama *Pinus nigra* Arnold

Analizom uzoraka u Laboratoriju za patologiju drveća na Šumarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu utvrđene su patogene gljive *Dothistroma* spp. izradom nativnog preparata iz uzoraka iglica crnoga bora s lokacije Novaki Pazinski (31. rujna 2015. i 29. svibnja 2016.). Patogene gljive *Dothistroma* spp. zabilježene su fotografskom digitalnom kamerom Motic, Moticam pro 252A u obliku fotografija (slika17.).



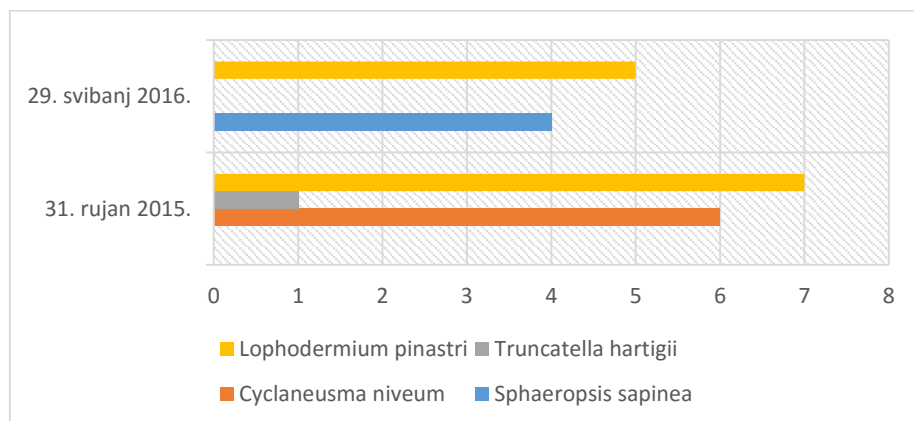
Slika 17. Plodna tijela i konidije *Dothistroma* spp. s uzoraka na lokaciji Novaki Pazinski (Milošić, 2015/2016)

Ovim istraživanjem obuhvaćene su u prvom redu *Dothistroma* spp., no prilikom praćenja stanja zaraze izvršena je i inventarizacija ostalih značajnih patogena koji se javljaju na borovim iglicama.

Osim *Dothistroma* spp. na pregledanim iglicama zabilježene su sljedeće vrste:

- ✓ *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko et Sutton
- ✓ *Cyclaneusma niveum* (Pers.) Di Cosmo, Peredo et Minter
- ✓ *Truncatella hartigii* (Tub.) Stey
- ✓ *Lophodermium pinastri* (Shrad. ex Hook.) Chév

Graf 3. Broj plodišta drugih patogenih gljiva na borovim iglicama 2015. i 2016. godine



Sphaeropsis sapinea (Fr.) Dyko et Sutton zabilježena je 1986. godine na crnom boru u Istri, Primorju i Dalmaciji (Halambek i Liović 1988), te 1992. godine na alepskom, brucijskom i crnom boru u Istri (Diminić 1994). Napada fiziološki oslabiljele borove uslijed suše ili neadekvatnih uvjeta staništa, te one koji su pretrpjeli oštećenja od abiotičkih i biotičkih čimbenika (Peace 1962). Pojedini autori *Cyclaneusma niveum* (Fr.) DiCosmo, Peredo et Minter smatraju za parazita, a drugi za saprotrofa. Glavaš (1981) spominje gljivu na iglicama alepskog i primorskog bora u Dalmaciji, te Diminić i sur. (1993) na iglicama alepskog i crnog bora u Istri. *Truncatella hartigii* (Tub.) Stay vrlo je česta na iglicama alepskog bora i pinije u Dalmaciji (Glavaš, 1988). Ponaša se kao saprotrof i nema utjecaja na njihovo sušenje. *Lophodermium pinastri* (Shrad. ex Hook.) Chév. utvrđena je na mladom crnom, alepskom, primorskom boru te piniji u cijelom sredozemnom području. Parazit je slabosti koji naseljava starije i sekundarne iglice. Slabih je parazitskih svojstava i ne uzrokuje sušenje biljaka.

5.2.3. Određivanje broja plodišta i zrelosti plodnih tijela *Dothistroma* spp.

Okularnim pregledom 100 iglica u jesen (31. rujan) te 100 iglica u kasno proljeće (29. svibanj) bilježeno je prisustvo broja plodišta *Dothistroma* spp. te kategorija zrelosti plodnih tijela (acervula). Podaci koji prikazuju broj plodišta kao i broj plodišta obzirom na kategorije razvijenosti obrađeni su programskim paketom StaSoft. Inc. (2011) STATISTICA version 10. Obradom dobivenih podataka dobili su se rezultati prikazani u nastavku.

Tablica 6. Deskriptivna statistika (broj uzoraka, prosjek, medijan, minimum, maksimum, varijanca, standardna varijanca, koeficijent varijacije) za broj plodišta po iglici za jesenske i proljetne uzorke

Variable	All Groups Descriptive Statistics							
	Valid N	Mean	Median	Minimum	Maximum	Variance	Std.Dev.	Coef.Var.
Broj plodišta <i>Dothistroma</i>	199	9,929648	2,000000	0,00	54,00000	174,7425	13,21902	133,1268

Tablica 7. Deskriptivna statistika (broj uzoraka, prosjek, medijan, minimum, maksimum, varijanca, standardna varijanca, koeficijent varijacije) za broj plodišta po iglici za jesenske uzorke

Variable	Razdoblje uzorkovanja=jesen Descriptive Statistics							
	Valid N	Mean	Median	Minimum	Maximum	Variance	Std.Dev.	Coef.Var.
Broj plodišta <i>Dothistroma</i>	99	0,232323	0,00	0,00	3,000000	0,384251	0,619880	266,8177

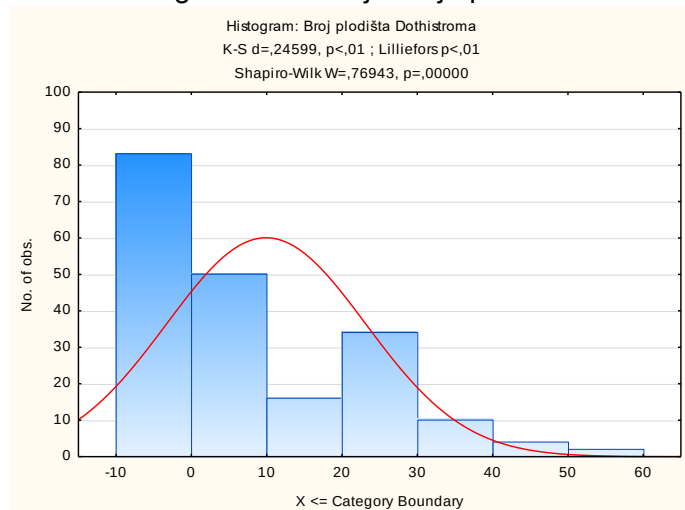
Tablica 8. Deskriptivna statistika (broj uzoraka, prosjek, medijan, minimum, maksimum, varijanca, standardna varijanca, koeficijent varijacije) za broj plodišta po iglici za proljetne uzorke

Variable	Razdoblje uzorkovanja=proljeće Descriptive Statistics							
	Valid N	Mean	Median	Minimum	Maximum	Variance	Std.Dev.	Coef.Var.
Broj plodišta <i>Dothistroma</i>	100	19,53000	20,50000	1,000000	54,00000	161,9688	12,72670	65,16485

5.2.3.1. Usporedba proljetnih i jesenskih uzoraka

Radi utvrđivanja tipa statističkog testa koji će se koristiti, izvršena je provjera normalnosti distribucije broja plodišta po iglicama, koja je prikazana histogramom distribucije broja plodišta *Dothistroma* spp. po iglicama i krivuljom normalne distribucije za jesenske i proljetne uzorke iglica crnog bora (graf 4.).

Graf 4. Histogram distribucije broja plodišta *Dothistroma* spp. i krivulja normalne distribucije



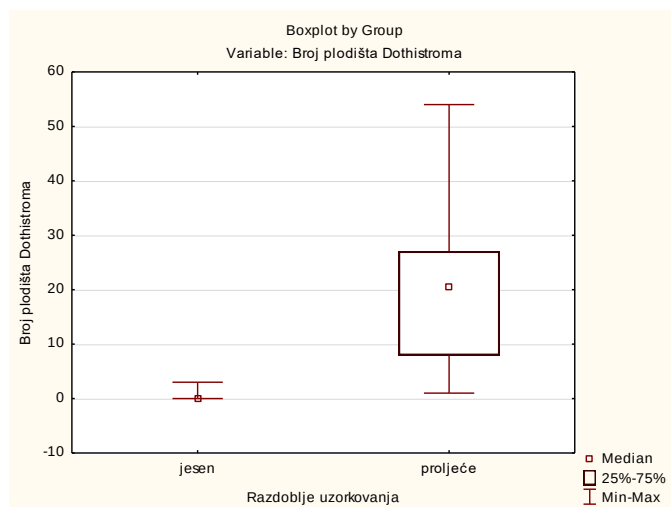
Opažena distribucija broja plodišta po iglici se statistički značajno razlikuje od normalne distribucije zbog čega se za usporedbu grupa uzoraka koristio neparametrijski Mann Whitney U test za usporedbu jesenskih i proljetnih uzoraka iglica crnog bora (tablica 9.).

Tablica 9. Neparametrijski Mann Whitney U test

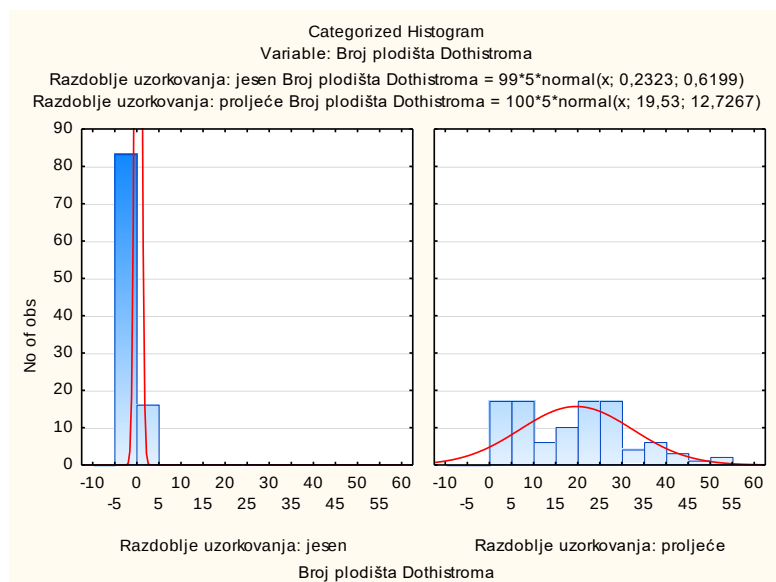
variable	Mann-Whitney U Test By variable Razdoblje uzorkovanja Marked tests are significant at p <,05000							
	Rank Sum jesen	Rank Sum proljeće	U	Z	p-value	Z adjusted	p-value	Valid N jesen
Broj plodišta <i>Dothistroma</i>	4986,50	14913,50	36,5000	-12,0950	0,00	-12,5631	0,00	99

P vrijednost je manja od 0,05, stoga se može zaključiti kako postoji statistički značajna razlika u broju plodišta po iglici crnog bora između proljetnih i jesenskih uzoraka, a što se vidi i iz sljedećih Box and Whisker grafikona te histograma (graf 5., graf 6.).

Graf 5. Usporedba broja plodišta po iglici između proljetnih i jesenskih uzoraka iglica običnog bora



Graf 6. Histogrami broja plodišta po iglici običnog bora za proljetne i jesenske uzorke



Kada se proljetni i jesenski uzorci iglica crnog bora usporede po broju plodišta u različitim stadijima zrelosti, uočava se kako postoji statistički značajna razlika u broju nerazvijenih, razvijenih te praznih plodišta (tablica 10.).

Tablica 10. Rezultati Mann-Whitney U testa za usporedbu proljetnih i jesenskih uzoraka prema broju plodišta različitih stadija zrelosti

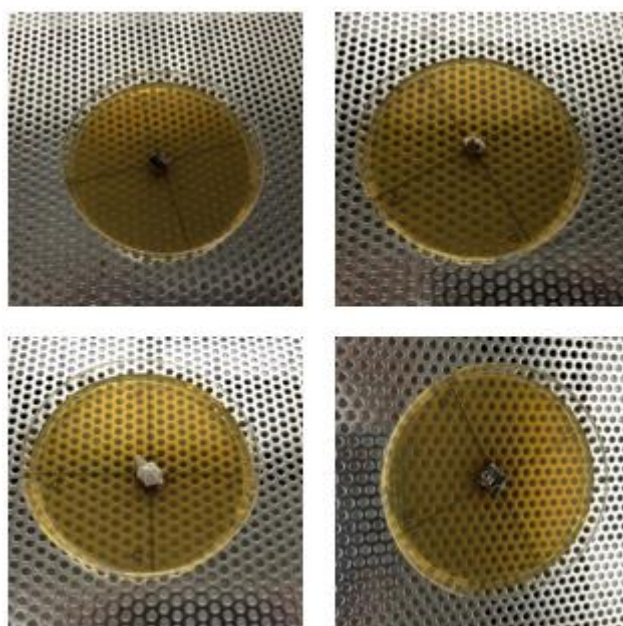
variable	Mann-Whitney U Test By variable Razdoblje uzorkovanja Marked tests are significant at p <,05000								
	Rank Sum jesen	Rank Sum proljeće	U	Z	p-value	Z adjusted	p-value	Valid N jesen	Valid N proljeće
nerazvijena	7493,500	12406,50	2543,500	-5,9232	0,000000	-6,9261	0,000000	99	100
polurazvijena	5458,000	14442,00	508,000	-10,9342	0,000000	-11,8997	0,000000	99	100
razvijena	5506,500	14393,50	556,500	-10,8148	0,000000	-11,8368	0,000000	99	100
prazna	9306,000	10594,00	4356,000	-1,4611	0,143990	-3,5415	0,000397	99	100

Na uzorku od 100 iglica u jesen i proljeće sakupljenih na lokaciji Novaki Pazinski uočeno je da je broj nerazvijenih, polurazvijenih, razvijenih i praznih plodišta značajno veći u proljeće 2016. nego u jesen 2015. Naime, u jesen 2015. bilo je najviše nerazvijenih plodnih tijela u obliku crne točke ispod epiderme što i odgovara životnom ciklusu *Dothistroma* spp. Navedena nerazvijena plodna tijela svoj nastavak razvoja nastavila su tijekom zime. Pojedina polurazvijena i razvijena plodna tijela zabilježena u jesen pripisuju se povoljnim temperaturama zraka i količini oborina za vrijeme i nakon infekcijskog perioda, njih je zanemarivo malo naspram proljeća.

U proljeće 2016. godine najviše je zabilježeno polurazvijenih plodnih tijela što obzirom na sve kategorije razvijenosti u potpunosti odgovara periodu u kojem se obavilo drugo sakupljanje iglica, budući da je glavno razdoblje infekcija tek počelo (travanj-kolovoz). Može se pretpostaviti da su tijekom razdoblja infekcija kategorije razvijenosti plodnih tijela promijenjive naravi i ovise o periodu u kojem je došlo do infekcije prethodne godine.

5.2.4. Određivanje morfologije spora (boja, oblik, veličina) te brzine rasta izolata na hranjivim podlogama

Nakon obavljenih tehnika izolacije patogene gljive *Dothistroma* spp. kotrljanjem acervula i premazivanjem hranjive podloge otopinom spora, Petrijeve zdjelice inkubirale su se na sobnoj temperaturi od 20 °C (17-22 °C) pri dnevnom svjetlu u zatvorenim prozirnim plastičnim posudama. Svaka dva tjedna se ravnalom bilježio rast pet izolata dobivenih u jesen 2015. i tri izolata dobivenih u proljeće 2016. godine (dva izolata bila su kontaminirana bakterijama) (tablice 11 i 12).



Slika 18. Bilježenje rasta izolata ravnalom svaka dva tjedna u 4 međusobno nasuprotna smjera (gore, dolje, lijevo, desno).

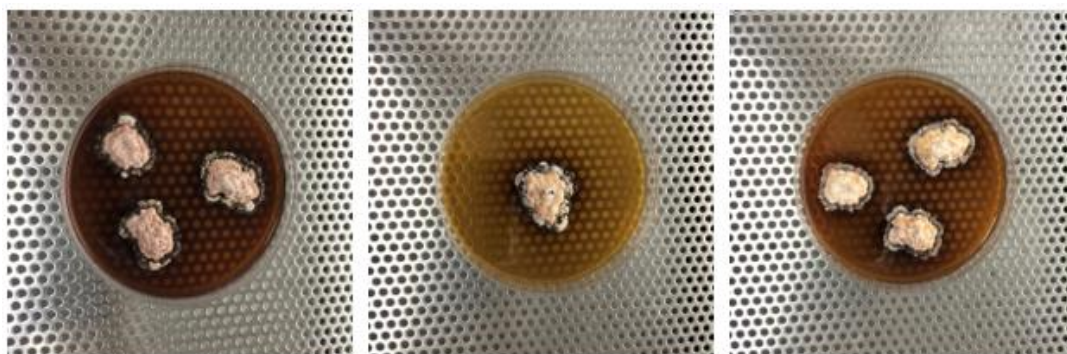
Tablica 11. Rast pet izolata dobivenih u jesen 2015

Novaki Pazinski, jesen (2015.)										
Datum	Petrijevka 1		Petrijevka 2		Petrijevka 3		Petrijevka 4		Petrijevka 5	
	Rast (mm)	Pros. rast (mm)	Rast (mm)	Pros. rast (mm)	Rast (mm)	Pros. rast (mm)	Rast (mm)	Pros. rast (mm)	Rast (mm)	Pros. rast (mm)
29.6.	0	3,50	0	3,46	0	2,67	0	3,21	0	3,29
13.7.	4,875		6		3,875		6,25		6,875	
27.7.	3,375		2,125		2,75		1,375		1,25	
17.8.	2,25		2,25		1,375		2		1,75	

Tablica 12. Rast tri izolata dobivenih u proljeće 2016. godine

Novaki Pazinski, proljeće (2016.)						
Datum	Petrijevka 1		Petrijevka 2		Petrijevka 3	
	Rast (mm)	Pros. rast (mm)	Rast (mm)	Pros. rast (mm)	Rast (mm)	Pros. rast (mm)
29.6.	0	3,04	0	3,88	0	3,46
13.7.	4,375		7,625		6,625	
27.7.	2,125		1,125		1,25	
17.8.	2,625		2,875		2,5	

Na hranjivoj podlozi prvo se pojavio bijeli micelij koji je kasnije postao sivo-smeđe boje i izrazito stromatičan (slika 19.). Na hranjivoj su se podlozi stvarale svjetlo crvenkasto-smeđe mrlje, a vremenom su vidljivi i crveni pigmenti. Na 20°C, micelij u prosjeku naraste 1,5-2 mm tjedno. Rast micelija izoliranih s uzoraka borovih iglica na lokaciji Novaki Pazinski 31.rujna 2015. u prosjeku se kretao 1,1-1,5 mm tjedno, dok su izolati s uzoraka borovih iglica 29. svibnja 2016. u prosjeku rasli 1,3-1,7 mm tjedno.



Slika 19. Miceliji *Dothistroma* spp. s vidljivim crvenim pigmentima (Kranjec, 2016)

Nakon što su se razvile kulture *Dothistroma* spp. u Petrijevim zdjelicama, koje su inkubirane na 20 °C i pri danjem svjetlu u zatvorenim prozirnim plastičnim posudama, micelij je nakon određenog vremena započeo sporulaciju stvarajući konidije. Konidije su vidljive u obliku bjelkaste ili hijaline sluzave mase. Fotografska digitalna kamera Motic, Moticam pro 252A koja je instalirana na mikroskop Olympus (model BX41) poslužila je kod dobivanja fotografija spora na temelju kojih su se odradila mjerenja dužine i širine 100 konidija. Isto tako mikroskopiranjem se potvrdila vrsta patogene gljive na temelju oblika i boje konidija. Na dobivenim fotografijama vidljive su konidije koje su bezbojne, ravne ili zakrivljene, cilindrične, hijalinske, tankostijene, lagano deblje pri vrhu nego pri dnu s 1-5 pregrada. Veličina konidija iznosi 11,2-41,6 x 1,5-3,6 μm (tablica 13.).

Tablica 13. Deskriptivna statistika dimenzija spora

Duljina spora (μm)		Širina spora (μm)	
Prosjek	27,80404	Prosjek	2,413131
Medijan	28,2	Medijan	2,4
Mod	35,6	Mod	2,4
Minimum	11,2	Minimum	1,5
Maksimum	41,6	Maksimum	3,6

6. RASPRAVA

Pregledom kultura crnoga bora 31. rujna 2015. godine i 29. svibnja 2016. godine na lokaciji Novaki Pazinski u središtu Istarske županije, nedaleko grada Pazina, utvrdile su se infekcije patogenom gljivom *Dothistroma* spp. na temelju karakterističnih simptoma. Razdoblje inkubacije i početni simptomi mogu se vidjeti u različitim godišnjim dobima, na lokaciji Novaki Pazinski zamijećeni su u jesen, što i potvrđuje pojavu u umjerenim područjima, dok npr. na Novom Zelandu oni se pojavljuju od sredine do kraja ljeta. Terenskim istraživanjem te analizom u Laboratoriju za patologiju drveća na Šumarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu nastojalo se doći do podataka za jasnije razumijevanje životnog ciklusa *Dothistroma* spp. Cilj je bio odrediti intenzitet zaraze u kulturama te određene aspekte njene morfologije i biologije. Na uzorku od 100 iglica u jesen ustanovljena su prema kategorijama razvijenosti nerazvijena plodišta (19), zatim slijede polurazvijena (2) te razvijena (1). Najčešći simptomi oboljenja bili su prisutni na jednogodišnjim iglicama, na pojedinim stablima primijećeni su i na iglicama iz tekuće vegetacije, a dvogodišnje iglice u potpunosti su bile osute. Osutost dvogodišnjih iglica odgovara Karadžićevom (1989) istraživanju koji je zabilježio da se zaražene iglice osipaju sa stabla u srpnju, prije početka glavne osutosti u jesen, iako zaražene iglice mogu otpasti u bilo koje doba godine. Pregledom kultura crnoga bora 29. svibnja 2016. ustanovljeno je prisustvo karakterističnih smeđih, crvenkasto-smeđih jako izraženih prstenova promjera 1-2 mm. Simptomi oboljenja bili su prisutni na jednogodišnjim iglicama. Plodnih tijela gljive, acervula, bilo je mnoštvo te su primijećena i golim okom. Sukladno tome, 2016. godine u kasno proljeće zabilježene su značajne razlike u broju plodišta na iglicama nasuprot jesenskim uzorcima. Na uzorku od 100 iglica na temelju kategorija razvijenosti plodnih tijela, zabilježena su polurazvijena plodna tijela (1219), zatim slijede razvijena (520), nerazvijena (191) te prazna (21). Općenito, simptomi infekcije najviše su se isticali na srednjedobnim stablima.

Na temelju dobivenih podataka o broju i razvijenosti plodnih tijela acervula na iglicama crnoga bora u jesen i proljeće zaključuje se da je na podneblju istarskoga područja najveći intenzitet infekcija u kasno proljeće/ljeto što odgovara jednogodišnjem životnom ciklusu razvoja patogena *Dothistroma* spp. U rujnu 2015. godine na lokaciji Novaki Pazinski pronađena su mjestimično polurazvijena te razvijena plodišta, što se podudara s porastom količina oborina od sredine srpnja i

povoljnim temperaturama zraka, no nedovoljno da bi se mogao potvrditi sekundarni vrhunac zaraza. Broj plodišta u jesen zanemarivo je mali, ali uslijed povoljnih klimatskih prilika ili ovisno o inokulumu ne smije se isključiti mogućnost sekundarnih vrhunaca zaraze u budućnosti. Štoviše, Gilmour (1981) je potvrdio cjelogodišnje infekcije iz dvotjednog eksperimenta kada su sadnice podvrgnute idealnim uvjetima. Karadžić (1989b) je također potvrdio ograničenu infekciju izvan glavnog proljetnog i ljetnog perioda infekcije s 4% zaraženih mladica u listopadu. Dva životna ciklusa patogena *Dothistroma* spp. potvrđena su i od drugih autora. Na Novom Zelandu Gilmour (1981) procjenjuje razinu infekcije *P. radiata* u različitim godišnjim periodima, u dvije od tri godine istraživanja zamijećene su infekcije: jedna u kasno proljeće / rano ljeto, te druga slabija u kasno ljeto / ranu jesen. U Čileu, Rack (1986) je opisao dva vrhunca produkcije spora; najveća u ljeto, sa sekundarnim maksimumom u kasnu jesen. Tradicionalni pogled na životni ciklus patogena smatra da konidije inficiraju iglice u proljeće i ljeto sa simptomima u razvoju tijekom jeseni i zime. Acervuli se razvijaju tijekom zime te otpuštaju konidije u proljeće i ljeto sljedeće godine od infekcije. Međutim, ranije infekcije mogu se, u pojedinim godinama, brzo razviti u zrelim acervulima koji oslobađaju konidije u ranu jesen i izazivaju drugi vrhunac infekcije. U stvari, neke infekcije se javljaju tijekom cijele godine, čak i tijekom zimskih mjeseci. Ponašanje patogena, dakle, nije u skladu s tradicionalnim pogledom na njegov životni ciklus. Više ciklusa infekcija godišnje nesumnjivo će dovesti do viših razina infekcija, a time i posljedica bolesti.

Dvije glavne vremenske varijable koje utječu na intenzitet bolesti su oborine i temperatura. Kao što znamo, oborine i voda neophodni su za širenje patogena. Prema podacima Državnog hrvatskog meteorološkog zavoda (DHMZ) za navedenu postaju, količina oborina u 2016. godini na temelju prvih 5 mjeseci značajno odstupa od 2015. godine. 2015. godine u razdoblju ostvarenja infekcija (travanj-kolovoz) količina oborina bila je ujednačena, kretala se od 42,5-54,8 mm s izraženijom količinom u kolovozu (112,7mm). Na temelju grafa (graf 1.) koji prikazuje količinu oborina za grad Pazin primijećuje se da je tijekom cijele 2015. godine količina oborina ujednačena, s porastom od kolovoza, a značajniji pad bilježi se jedino u prosincu. Količina oborina u razdoblju ostvarenja infekcija bila je dostatna da se konidije oslobode, distribuiraju disperznim raspršivanjem i otjecanjem, prokliju te ostvare infekcije, što se i potvrdilo brojnim plodnim tijelima s uzoraka 29. svibnja 2016. godine. Potvrđeno je da i mala količina oborina omogućuje širenje dovoljno

konidija koje uzrokuju visoke razine infekcije (Mullet, 2014). Također može se zaključiti na temelju količine oborina u travnju i svibnju 2016. godine da će i nadolazeći ciklus imati povoljne uvjete za konidije i njihovo otpuštanje. Temperatura je također bitna, utječe na razvoj acervula. Srednja mjesečna temperatura zraka 2015. godine u razdoblju ostvarenja infekcija odgovarala je referentnim vrijednostima za klijanje konidija opisanima u dostupnoj literaturi (EPPO, 2008; Gibson i sur., 1964; Ivory, 1967, 1972; Gibson, 1971; Bulman, 2008; Karadžić, 1994; Sheridan i Yen 1970). 2016. godine zabilježeni su također povoljni uvjeti za gljivu, srednja mjesečna temperatura zraka za travanj iznosila je 11,7 °C, a za svibanj 14,2 °C. Na temelju temperatura zraka za travanj i svibanj u korelaciji s količinom oborina može se zaključiti da u tekućoj godini bi mogle biti ostvarene još izraženije infekcije domaćina *Pinus nigra* Arnold, no za takve zaključke potrebni su kontinuirani podaci i uzorci cijele sezone. Prema grafikonu (graf 1.) srednjih mjesečnih količina oborina za grad Pazin, može se vidjeti da od sredine srpnja 2015. godine količina oborina postepeno raste, što je vjerojatno, uz povoljne temperature pogodovalo gljivi *Dothistroma* spp., a koje se može i potvrditi prisutnošću manjeg broja plodnih tijela i konidija na uzorcima sakupljenim 30. rujna 2015. godine.

U područjima sjeverne hemisfere opustošenih *D. septosporum*, količina oborina u razdoblju od lipnja do rujna pokazala je da je dobar pokazatelj ozbiljnosti bolesti (Peterson, 1973). U Finskoj, simptomi i plodišta *D. septosporum* zabilježeni su na borovima nakon blage i kišovite zime (Müller i sur., 2009). Slično tome, Woods i sur. (2005) navode da je, tijekom kasnih 1990-ih i ranih 2000-ih, izbijanje bolesti u Britanskoj Kolumbiji bilo posljedica povećane ljetne kiše. Dakle, porast oborina tijekom godine značajno bi mogao utjecati na pojavu infekcija. Topla temperatura i obilna vlaga ubrzavaju simptome i razvoj plodnih tijela samim time i širenje spora. Klimatske promjene prijete povećanjem infekcija, što može uzrokovati izvanredne situacije u težini i intenzitetu bolesti.

Što se tiče morfologije spora primjećuje se da dimenzije širine i duljine konidija uglavnom odgovaraju EPPO-vim standardima, time da je zabilježena nešto manja minimalna duljina od standarda i veća maksimalna širina. Veličina konidija s uzoraka lokacije Novaki Pazinski iznosi 11,2-41,6 µm (duljina) x 1,5-3,6 µm (širina) (tablica 13.), dok EPPO-ovi standardi iznose 12–28–48 (do 64) × 1,5–3 µm.

7. ZAKLJUČAK

Dothistroma spp. brzo može uznapredovati do epidemije pod odgovarajućim uvjetima. To dovodi do teške defolijacije, smanjenja ili prestanka rasta te u ekstremnim slučajevima odumiranja stabla. Posljedice *Dothistroma* spp. ovise o nekoliko čimbenika; osjetljivosti domaćina, starosti domaćina, uvjetima okoline te intenzitetu bolesti. U šumskim područjima kontrolne mjere *Dothistroma* spp. uključuju korištenje rezistentnih vrsta, kemijskih pripravaka te šumskouzgojnih radova koji uključuju orezivanja stabala radi smanjenja vlažnosti i povećanja cirkulacije zraka unutar sastojine. Time se stvaraju uvjeti okoline koji manje pogoduju gljivi za ostvarenje infekcija, uklanja se inokulum i učinkovitost otpuštanja spora kišom. Čišćenje i orezivanje šumskih sastojina smanjiti će količinu otpalih iglica zadržanih u krošnji i dopustiti iglicama put do šumskog tla. Pad broja konidija u šumskoj prostirci ukazuje na to da ovaj izvor inokuluma predstavlja samo ograničenu prijetnju borovima. Mnogo istraživanja je učinjeno što se tiče kemijske kontrole bolesti. Mnogi fungicidi su učinkoviti protiv gljive, najviše korišteni su bakreni oksiklorid i bakrov oksid zbog svoje učinkovitosti i niske cijene (Gibson, 1974; Ray - Vanner, 1988; Bulman, Ganley i Dick, 2008). U većem dijelu Europe zračna aplikacija fungicida za kontrolu *Dothistroma* spp. može se smatrati neekonomičnom i neprihvatljivom zbog zdravlja i brige za okoliš. Na primjer, u Velikoj Britaniji standardi u šumarstvu (Šumarska komisija, 2011) navode da je korištenje umjetnih pesticida i gnojiva, zadnji potez u praksi održivog šumarstva. Međutim, zbog povećanja bolesti i štetnika opcija je koja treba biti razmatrana. Dugoročna strategija za kontrolu *Dothistroma* spp. su rezistentne biljne vrste. Neka pojedinačna stabala, u jako zaraženim sastojinama, imala su manji intenzitet infekcije (Ivory i Paterson, 1970; Wilcox, 1982). Naime, stabla s nižim intenzitetom infekcije vegetativno su razmnožavana, a neke od dobivenih rameta otkrivene su da zadrže nižu osjetljivost od orteta (Ivory i Paterson, 1970; Wilcox, 1982). Ipak, dobici od smanjenja osjetljivosti na bolest moraju biti uravnoteženi s oblikom, stopom rasta i svojstvima drva. U dijelovima Europske unije obje vrste *Dothistroma* spp. su prisutne i na taj način postoji široka genetska varijabilnost. Treba imati na umu da i stabla niske osjetljivosti mogu postati inficirana pod utjecajem visokog inokuluma i uvjeta povoljnih za gljivu.

Na temelju navedenih činjenica i dobivenih rezultata može se zaključiti da je potrebno kontinuirano praćenje gljive *Dothistroma* spp., poglavito radi njezina

kroničnog karaktera i prisustva na uzorkovanim borovima duži niz godina. Tome u prilog idu i klimatske promjene koje su u tijeku i koje će uvelike pogodovati stvaranju infekcija. Vrijeme i uvjeti koji utječu na proces infekcije od temeljne su važnosti za epidemiologiju bolesti. Takve informacije mogu se koristiti za ciljane mjere kontrole, predviđanje opsega bolesti u još nezaraženim područjima, kao i razmjera bolesti u budućim scenarijima klimatskih promjena. Informacije o intenzitetu inokuluma također omogućuju jasnije razumijevanje vremenskih prilika o kojima ovisi proizvodnja i otpuštanje spora, a time i intenzitet bolesti u šumskim ekosustavima.

LITERATURA

- Barnes, I., Crous, P.W., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J., 2004: Multigene phylogenies reveal that red band needle blight of *Pinus* is caused by two distinct species of *Dothistroma*, *D. septosporum* and *D. pini*. *Studies in Mycology*, 50, 551–565.
- Barnes, I., Kirisits, T., Akulov, A., Chhetri, D.B., 2008: New host and country records of the *Dothistroma* needle blight pathogens from Europe and Asia. *Forest Pathology*, 38 (3), 178–195.
- Barnes, I., Kirisits, T., Wingfield, M.J., Wingfield, B.D., 2011: Needle blight of pine caused by two species of *Dothistroma* in Hungary. *Forest Pathology*, 41 (5), 361–369.
- Barr, M.E., 1996: Planistromellaceae, a new family in the Dothideales. *Mycotaxon*, 60, 433–442.
- Bradshaw, R.E., 2004: *Dothistroma* (red-band) needle blight of pines and the dothistromin toxin: a review. *Forest Pathology*, 34 (3), 163–185.
- Bradshaw, R.E., Bidlake, A., Forester, N., Scott, D.B., 1997: Transformation of the fungal pathogen *Dothistroma pini* to hygromycin resistance. *Mycological Research* 101, 1247–1250.
- Bradshaw, R.E., Ganley, R.J., Jones, W.T., Dyer, P.S., 2000: High levels of dothistromin toxin produced by the forest pathogen *Dothistroma pini*. *Mycological Research*, 104, 325–332.
- Brown, A., Clayden, H., 2012: Time for action. *Dothistroma* (red band) needle blight in Scotland. *Forestry Journal* 2/12.
- Brown, A.V., Webber, J., 2008: Red band needle blight of conifers in Britain. *Research Note - Forestry Commission*, (002), 8–8.
- Bulman, L., Ganley, R.J., Dick, M., 2008: Needle diseases of radiata pine in New Zealand. *Scion, Client report no. 13010*.
- Bulman, L.S., 1993: *Cyclaneusma* needle-cast and *Dothistroma* needle blight in NZ pine plantations. *New Zealand Forestry*, 38 (2), 21–24.

Bulman, L.S., 2008: *Dothistroma* needle blight. Forest Pathology in New Zealand No 5. New Zealand Farm Forestry Association.

Butin, H., 1985: Teleomorph-und anamorph-Entwicklung von *Scirrhia pini* Funk & Parker auf Nadeln von *Pinus nigra* Arnold.[Teleomorph and anamorph development of *Scirrhia pini* Funk & Parker of needles from *Pinus nigra* Arnold]. In: *Sydowia, Annales Mycologici Ser. II*. 1985, 20–27.

Cobb, F.W., Miller, D.R., 1968: Hosts and geographic distribution of *Scirrhia pini*--the cause of red band needle blight in California. *Journal of Forestry*, 66 (12), 930–933.

Diminić, D., 1994: Prilog poznavanju mikoza borovih kultura u Istri. Glasnik za šumske pokuse, Vol. 30, str. 21-60.

Doroguine, G., 1911: Une maladie cryptogamique du pin. *Bulletin Trimestriel de la Société Mycologique de France*, 27 (1), 105–106.

Drenkhan, R., Hanso, M., 2009: Recent invasion of foliage fungi of pines (*Pinus* spp.) to the Northern Baltics. *Forestry Studies/Metsanduslikud uurimused*, 51 (1), 49–64.

Edwards, D.W., Walker, J., 1978: *Dothistroma* needle blight in Australia. *Australian Forest Research*, 8 (2), 125–137.

Eldridge R.H., Turner J., Lambert M.J., 1981: *Dothistroma* needle blight in a New South Wales *Pinus radiata* plantation in relation to soil types. *Australian Forestry*, 44, 42–45.

Elliott, G.S., Mason, R.W., Ferry, D.G., Edwards, I.R., 1989: *Dothistroma* risk assessment for forestry workers. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 19, 163–170.

EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization), 2008: EPPO Standards PM 7/46 (2) Diagnostics *Mycosphaerella dearnessii* and *Mycosphaerella pini*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 38, 349–362.

Etheridge, D.E., 1967: The role of secondary organisms in *Dothistroma*-infected *Pinus radiata*. *New Zealand Forest Service, Forest Research Institute, Forest Pathology Report Series 24*.

Evans, H.C., 1984: The genus *Mycosphaerella* and its anamorphs *Cercoseptoria*, *Dothistroma* and *Lecanosticta* on pines. *Mycological Paper*, (153), 102–102.

Ferguson, L.R., Parslow, M.I., McLarin, J.A., 1986: Chromosome damage by dothistromin in human peripheral blood lymphocyte cultures: a comparison with aflatoxin B-1. *Mutation Research*, 170, 47–54.

Funk, A., Parker, A.K., 1966: *Scirrhia pini* n. sp., the perfect state of *Dothistroma pini* Hulbary. *Canadian Journal of Botany*, 44 (9), 1171–1176.

Gadgil, P.D., 1967: Infection of *Pinus radiata* needles by *Dothistroma pini*. *New Zealand Journal of Botany*, 5 (4), 498–503.

Gadgil, P.D., 1970: Survival of *Dothistroma pini* on fallen needles of *Pinus radiata*. *New Zealand Journal of Botany*, 8 (3), 303–309.

Gadgil, P.D., 1974: Effect of temperature and leaf wetness period on infection of *Pinus radiata* by *Dothistroma pini*. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 4 (3), 495–501.

Gadgil, P.D., 1984: Dothistroma needle blight. *Forest Pathology in New Zealand, Forest Research Institute, New Zealand*, (5), 8–8.

Gibson, I., Christensen, P.S., Munga, F.M., 1964: First observations in Kenya of a foliage disease of pines caused by *Dothistroma pini* Hulbary. *Commonwealth Forestry Review*, 43, 31–48.

Gibson, I.A.S., 1972: Dothistroma blight of *Pinus radiata*. *Annual review of Phytopathology*, 10 (1), 51–72.

Gibson, I.A.S., 1974: Impact and control of dothistroma blight of pines. *European Journal of Forest Pathology*, 4 (2), 89–100.

Gilmour, J.W., 1981: The effect of season on infection of *Pinus radiata* by *Dothistroma pini*. *European Journal of Forest Pathology*, 11 (5/6), 265–269.

Glavaš, M., 1999: Gljivične bolesti šumskog drveća. Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 281.

Glavaš, M., 1988: Istraživanja parazitske gljive *Elytroderma torres-juanii* Diamandis et Minter na borovim iglicama u Dalmaciji. Zagreb, doktorska disertacija.

Glavaš, M., 1981: Prilog poznavanju proširenosti gljive *Naemacyclus niveus* Fuck, ex Sacc. na borovim iglicama u SR Hrvatskoj. *Zaštita bilja*, Vol. 32 (2), br. 156, str. 155–159.

Goodwin, S.B., Dunkle, L.D., Zismann, V.L., 2001: Phylogenetic analysis of *Cercospora* and *Mycosphaerella* based on the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. *Phytopathology*, 91, 648–658.

Gremmen, J., 1968: The presence of *Scirrhia pini* Funk et Parker in Romania (Conidial stage: *Dothistroma pini* Hulb.). *Bulletin Trimestiel de la Société Mycologique de France*, 84, 489–492.

Halambek, M., Liović, B., 1988: Propadanje crnog bora (*Pinus nigra* Arn.) na području Istre, Primorja i Dalmacije. Zbornik radova. Drugo savjetovanje o naučno-istraživačkom radu Šumarskog instituta Jastrebarsko, vol. 23, br. 75, str. 135-139.

Harvey, A.M., Batt R.D., Pritchard, G.G., 1976: Inhibition of RNA synthesis in *Chlorella pyrenoidosa* and *Bacillus megaterium* by the pine blight toxin, dothistromin. *Journal of General Microbiology*, 95, 268-276.

Hulbary, R.L., 1941: A needle blight of Austrian Pine. *III. Natural History Survey Bulletin* 21, 231–236.

Hunt, R.S., Roke, G., Cleary, M., Carlson, M., Berger, V., 2011: *Dothistroma* needle blight on western white pine in British Columbia. *Canadian Plant Disease Survey*, 91, 158-167.

Ito, K., Zinno, Y., Suto, Y., 1975: *Dothistroma* needle blight of pines in Japan. *Bulletin of the Government Forest Experiment Station*.

Ivory, M.H., 1967a: A new variety of *Dothistroma pini* in Kenya. *Transactions of the British Mycological Society*, 50 (2), 289–297.

Ivory, M.H., 1967b: Spore germination and growth in culture of *Dothistroma pini* var. *keniensis*. *Transactions of the British Mycological Society*, 50 (4), 563–572.

Ivory, M.H., 1972a: Infection of *Pinus radiata* foliage by *Scirrhia pini*. *Transactions of the British Mycological Society*, 59 (3), 365–375.

Ivory, M.H., 1990: Needle diseases of pines in Nepal. *Banko Janakari*, 2 (3), 209–212.

Ivory, M.H., 1994: Records of foliage pathogens of *Pinus* species in tropical countries. *Plant Pathology*, 43 (3), 511–518.

- Ivory, M.H., Paterson, D.N., 1970: Progress in breeding *Pinus radiata* resistant to Dothistroma needle blight in East Africa. *Silvae Genetica*, 19, 38–42.
- Jones, W.T., Harvey, D., Jones, S.D., Sutherland, P.W., Nicol, M.J., Sergejew, N., Debnam, P.M., Cranshaw, N., Reynolds, P.H., 1995: Interaction between the phytotoxin dothistromin and *Pinus radiata* embryos. *Phytopathology*, 85, 1099–1104.
- Kabir, M.S., Ganley, R.J., Bradshaw, R.E., 2014: Dothistromin toxin is a virulence factor in dothistroma needle blight of pines. *Plant Pathology*.
- Kabir, S., Ganley, R.J., Bradshaw, R. E., 2015: Dothistromin toxin is a virulence factor in dothistroma needle blight of pines. *Plant. Pathol.* 64, 225–234.
- Karadžić, D.M., 1989b: *Scirrhia pini* Funk et Parker. Life cycle of the fungus in plantations of *Pinus nigra* Arn. in Serbia. *European Journal of Forest Pathology*, 19 (4), 231–236.
- Karadžić, D.M., 1994: *Picea omorika* - a new host of *Dothistroma septospora*. *European Journal of Forest Pathology*, 24 (5), 300–303.
- Kirisits, T., Cech, T.L., 2006: Does Dothistroma needle blight develop into a forest health problem in Austria? *Forstschutz Aktuell*, (36), 20–26.
- Kirisits, T., Cech, T.L., 2007: Remarkable occurrence of *Dothistroma* needle blight on Swiss stone pine trees in the upper Mur valley. *Forstschutz Aktuell*, 41, 13–15.
- Lambert, M.J., 1986: Sulphur and nitrogen nutrition and their interactive effects on Dothistroma infection in *Pinus radiata*. *Canadian Journal of Forest Research*, 16 (5), 1055–1062.
- Morelet, M., 1968b: De Aliquibus in Mycologia Novitatibus (3e note). *Bulletin de la Societe des Sciences Naturelles et d'Archeologie de Toulon et du Var*. 1779.
- Morelet, M., 1969: *Scirrhia pini*: Note Complementaire. *Bulletin Mensuel de la Société Linnéenne de Lyon*, 38, 268–270.
- Müller, M.M., Hantula, J., Vuorinen, M., 2009: First observations of *Mycosphaerella pini* on Scots pine in Finland. *Plant Disease*, 93, 322.
- Mullet, M.S., 2014: The Epidemiology of Dothistroma Needle Blight in Britain. PhD Thesis. Imperial College London.

Munk, A., 1957: Danish Pyrenomycetes. A preliminary flora. *Dansk Botanisk Arkiv*, 17, 312.

Murray, J.S., Batko, S., 1962: *Dothistroma pini* Hulbary: A new disease on pine in Britain. *Forestry*, 34 (1), 57–65.

Old, K.M., Dudzinski, M.J., 1999: Forest pathogen introductions to Australia: experiences, threats and counter measures. In: Current and potential impacts of pitch canker in radiata pine. Proceedings of the IMPACT Monterey Workshop. Eds Devey ME, Matheson AC and Gordon TR. CSIRO, Australia, 11–20.

Parker, A.K., Collis, D.G., 1966: *Dothistroma* needle blight of pines in British Columbia. *Forestry Chronicle*, 42, 160–161.

Partridge, J. E., 1998: *Dothistroma* needle blight of pines. Department of Plant Pathology, University of Nebraska-Lincoln.

Pehl, L., Butin, H., 1992: *Dothistroma septospora*, a new fungus pest on *Pinus mugo*. *AFZ, Allgemeine Forst Zeitschrift*, 47 (14), 758–760.

Pehl, L., Wulf, A., 2001: Mycosphaerella-needle fungi on pines—symptoms, biology and differential diagnosis. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes*, 53, 217–222.

Peterson, G.W., 1966: Penetration and infection of Austrian and ponderosa pine by *Dothistroma pini*. *Phytopathology*, 56, 894–895.

Peterson, G.W., 1969b: Growth of germ tubes of *Dothistroma pini* conidia positively directed toward stomata of Austrian and Ponderosa pine needles. *Phytopathology*, 59, 1044.

Peterson, G.W., 1973: Infection of Austrian and ponderosa pines by *Dothistroma pini* in Eastern Nebraska. *Phytopathology*, 63 (8), 1060–1063.

Peterson, G.W., 1982: *Dothistroma* needle blight of pines. *US. Department of Agriculture. Forest Insect & Disease Leaflet* 143.

Peterson, G.W., Harvey, G.M., 1976: Dispersal of *Scirrhia (Dothistroma) pini* conidia and disease development in a shore pine plantation in Western Oregon. *Plant Disease Reporter*, 60 (9), 761–764.

- Peterson, G.W., Walla, J.A., 1978: Development of *Dothistroma pini* upon and within needles of Austrian and ponderosa pines in eastern Nebraska. *Phytopathology*, 68 (10), 1422–1430.
- Punithalingam, E., Gibson, I.A.S., 1973: *Scirrhia pini*. [Descriptions of Fungi and Bacteria]. *IMI Descriptions of Fungi and Bacteria*, (37), 368–368.
- Rack, K., 1986: On the seasonal release of *Dothistroma pini* conidia in *Pinus radiata* plantations in southern Chile. *European Journal of Forest Pathology*, 16 (1), 6–10.
- Ray, J.W., Vanner, A.L., 1988: Improvements in the technology of *Dothistroma* control. *What's New in Forest Research*, (169), 4–4.
- Ridley, G.S., Dick, M.A., 2001: An introduction to the diseases of forest and amenity trees in New Zealand. Forest Research Bulletin 220. Forest Research Institute, Rotorua, New Zealand.
- Saccardo, P.A., 1920: Mycetes Boreali-Americani. *Nuovo Giornale Botanico Italiano*, 27, 75–88.
- Schwelm, A., Barron, N.J., Baker, J., Dick, M., et al., 2009: Dothistromin toxin is not required for dothistroma needle blight in *Pinus radiata*. *Plant Pathology*, 58 (2), 293–304.
- Shain, L., Franich, R.A., 1981: Induction of *Dothistroma* blight symptoms with dothistromin. *Physiological Plant Pathology*, 19 (1), 49–55.
- Sheridan, J.E., Yen, C.C., 1970: A note on the effect of temperature and relative humidity on the germination of conidia of a New Zealand isolate of *Dothistroma pini* hulbary. *New Zealand Journal of Botany*, 8 (4), 658–660.
- Shishkina, A.K., Tsanova, N.I., 1966b: Study of the red needle spot of pine in Georgia. Trudy Instytutu zashchity rastenii. Tbilisii, 18, 285–295.
- Stoessl, A., Abramowski, Z., Lester, H.H., Rock, G.L., Towers, G.H.N., 1990: Further toxic properties of the fungal metabolite dothistromin. *Mycopathologia*, 112, 179–186.
- Sutton, B.C., 1980: *The Coelomycetes: Fungi imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stremata*. Kew, Commonwealth Mycological Institute.
- Šumarska komisija, 2011: The UK Forestry Standard. The government's approach to sustainable forestry. Forestry Commission, Edinburgh, 108.

Taylor, J.E., Schwandt, J.W., 1998: *Dothistroma* needle blight of lumber pine in Montana. Forest Health Protection Report No 98. USDA Forest Service, Forest Health Protection. Missoula, USA.

Thyr, B.D. & Shaw, C.G., 1964: Identity of the fungus causing red band disease on pines. *Mycologia*, 103–109.

Timmerman, A.D., 2011: *Dothistroma* needle blight of pine. Department of Plant Pathology, University of Nebraska-Lincoln.

Trotter, A., 1931: P. A. Saccardo's Supplementum Universale. *Sylloge Fungorum*, 25, 480.

Ušćuplić, M., 1996: Patologija šumskog i ukrasnog drveća. Šumarski fakultet Sarajevo, 366.

Van der Pas, J.B., 1981: Reduced early growth rates of *Pinus radiata* caused by *Dothistroma pini*. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 11, 210–220.

Watt, M.S., Kriticos, D.J., Alcaraz, S., Brown, A.V., et al., 2009: The hosts and potential geographic range of *Dothistroma* needle blight. *Forest Ecology and Management*, 257 (6), 1505–1519.

Wilcox, M.D., 1982: Genetic variation and inheritance of resistance to *Dothistroma* needle blight in *Pinus radiata*. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 12 (1), 14–35.

Woods, A., Coates, K.D., Hamann, A., 2005: Is an unprecedented *Dothistroma* needle blight epidemic related to climate change? *Bioscience*, 55, 761–769.

MREŽNI IZVORI:

Bulman, L.S. *Dothistroma* needle blight. 2008.

URL: <http://www.nzffa.org.nz/farm-forestry-model/the-essentials/forest-health-pests-and-diseases/diseases/Needle-diseases/Dothistroma/dothistroma-needle-blight/>
(06.09.2016.)

Dinarsko gorje. Hrvatska reljefna karta.

URL: <http://www.dinarskogorje.com/karte---besplatne-online.html> (09.09.2016.)

EPPO. *Dothistroma septosporum*: Distribution. 2016.

URL: <https://gd.eppo.int/taxon/SCIRPI/distribution> (20.08.2016.)

EPPO. *Dothistroma pini*: Distribution. 2016.

URL: <https://gd.eppo.int/taxon/DOTSPI/distribution> (20.08.2016.)

EPPO. *Mycosphaerella pini*. 2008.

URL: <http://photos.eppo.int/index.php/search/Mycosphaerella+pini> (24.08.2016.)

EPPO. *Dothistroma septosporum*: Photos.

URL: <https://gd.eppo.int/taxon/SCIRPI/photos> (29.08.2016.)

Fraser, S., Martin-Garcia, J., Perry, A. A review of *Pinaceae* resistance mechanisms against needle and shoot pathogens with a focus on the *Dothistroma–Pinus* interaction. 2015.

URL: [http://www.fabinet.up.ac.za/publication/pdfs/2218-fraser et al 2015 resistance mechanisms doth-pinus interaction.pdf](http://www.fabinet.up.ac.za/publication/pdfs/2218-fraser_et_al_2015_resistance_mechanisms_doth-pinus_interaction.pdf) (09.09.2016.)

Google. Novaki Pazinski. 2016.

URL: <https://www.google.hr/maps/place/Novaki+Pazinski/>. (03.09.2016.)

Leksikografski zavod Miroslav Krleža. Geomorfologija. 2008.

URL: <http://istra.lzmk.hr/clanak.aspx?id=957> (20.08.2016.)

Maphill. Satellite Map of Istra. 2011.

URL: <http://www.maphill.com/croatia/istra/maps/satellite-map> (21.08.2016)

Soukup, F. *Dothistroma* needle blight (*Mycosphaerella pini*) Rostr. 2000.

URL: <http://www.ipmimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=2111012> (27.08.2016.)