Uloga gljiva u odumiranju Hrasta lužnjaka (Quercus robur L.) na području GJ Desićevo (šumarija Gunja, UŠP Vinkovci)

Damijanić, Darwin

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:108:167658

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

University of Zagreb Faculty of Forestry and Wood Technology

ŠUMARSKI FAKULTET SVEUČILIŠTA U ZAGREBU

ŠUMARSKI ODSJEK

SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

UZGAJANJE I UREĐIVANJE ŠUMA S LOVNIM GOSPODARENJEM

DARWIN DAMIJANIĆ

ULOGA GLJIVA U ODUMIRANJU HRASTA LUŽNJAKA (*Quercus robur* L.) NA PODRUČJU GJ DESIĆEVO (ŠUMARIJA GUNJA, UŠP VINKOVCI)

DIPLOMSKI RAD

ZAGREB, 2021.

ŠUMARSKI FAKULTET SVEUČILIŠTA U ZAGREBU

ŠUMARSKI ODSJEK

ULOGA GLJIVA U ODUMIRANJU HRASTA LUŽNJAKA (*Quercus robur* L.) NA PODRUČJU GJ DESIĆEVO (ŠUMARIJA GUNJA, UŠP VINKOVCI)

DIPLOMSKI RAD

Diplomski studij: Uzgajanje i uređivanje šuma s lovnim gospodarenjem

Predmet: Integrirana zaštita šuma

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

Student: Darwin Damijanić

JMBAG: 0068219387

Broj indeksa: 1002/18

Datum odobrenja teme: 04.05.2021.

Datum predaje rada: 1.06.2021.

Datum obrane rada: 18.06.2021.

Zagreb, lipanj, 2021.

Dokumentacijska kartica:

Naslov	Uloga gljiva u odumiranju hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.) na području GJ Desićevo (šumarija Gunja, UŠP Vinkovci)
Title	The role of fungi in *Quercus robur* dieback in the area of the management unit Desićevo (forestry office Gunja, forestry administration Vinkovci)
Autor	Darwin Damijanić
Adresa autora	Trg Marka Zelka 1, 52352 Kanfanar
Mjesto izrade	Sveučilište u Zagrebu Šumarski fakultet
Vrsta objave	Diplomski rad
Mentor	Prof.dr.sc. Danko Diminić
Komentorica	Dr.sc. Jelena Kranjec Orlović
Godina objave	2021.
Obujam	Broj stranica:26 Broj slika:18 Broj tablica:3 Navoda literature:23
Ključne riječi	molekularna identifikacija, sušenje hrasta, *Diaporthe eres*
Key words	molecular identification, oak dying, *Diaporthe eres*
Sažetak	Tijekom 2020. godine u Gospodarskoj jedinici Desićevo primijećeno je sušenje pomlatka hrasta lužnjaka na površini od 66 hektara. Cilj ovog istraživanja je utvrditi koji su taksoni gljiva prisutni u zaraženim biljkama. Gljive su sa simptomatičnih dijelova izolirane na hranjive podloge te su nakon toga identificirane molekularnim metodama.

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

_____

Darwin Damijanić

U Zagrebu, 18.6.2021.

Zahvale

Svima koji su na bilo koji način pomogli u izradi ovoga rada, od srca veliko hvala.

Posebno se zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Danku Diminiću na predloženoj temi i iskazanom povjerenju za izradu ovog diplomskog rada te savjetima i pomoći.
Jedno veliko hvala komentorici dr.sc. Jeleni Kranjec Orlović na velikoj pomoći u izradi laboratorijskog i pisanog dijela istraživanja te na njenim detaljnim savjetima, komentarima i strpljenju. Zahvaljujem se i doc. dr. sc. Milivoju Franjeviću na sakupljenim uzorcima potrebnim za istraživanje.
Veliko hvala na pomoći i riječima ohrabrenja mojih baka i djedova u najtežim trenucima studija, a posebno baki Dragici koja bi me nazvala „samo da me čuje“ i popravila i najteži dan.
Hvala i svim mojim prijateljima koji su mi bili potpora i učinili ovaj studentski život zabavnijim i nezaboravnim, a posebno mojoj Sanji uz čiju sam podršku i motivaciju s lakoćom nastavio dalje.
I na kraju, naj više se zahvaljujem mojim roditeljima Janku i Meliti te sestri Angelici na velikoj pomoći i izuzetnom strpljenju prilikom cijelog studiranja, bez vas ovo ne bi bilo moguće.

Sadržaj

1. Uvod i cilj istraživanja 1
1.1. Hrast lužnjak (*Quercus robur* L.) i njegov značaj za šumarstvo u Hrvatskoj 1
1.2. Bolesti i štetnici na hrastu lužnjaku 3
1.3. Cilj istraživanja 8
2. Materijali i metode istraživanja 10
2.1. Područje istraživanja 10
2.2. Uzimanje uzoraka na terenu 11
2.3. Izolacija patogena iz biljnog tkiva na hranjivu podlogu 12
2.4. Identifikacija taksona izoliranih gljiva molekularnim metodama 13
3. Rezultati istraživanja 18
3.1. Utvrđeni taksoni gljiva 19
4. Rasprava 22
5. Zaključak 24
6. Literatura 25

Popis slika

Slika 1. Areal hrasta lužnjaka (Idžojtić, 2013.) 1
Slika 2. Šuma hrasta lužnjaka sa običnim grabom 2
Slika 3. Prikaz kretanja značajne osutosti (< 25% osutosti) krošanja nekih vrsta šumskog drveća u Republici Hrvatskoj za razdoblje od 2009. – 2019. (Potočić i sur., 2019) 3
Slika 4. Mužjak i ženka gubara 5
Slika 5. Hrastova pepelnica (Diminić, 2007) 6
Slika 6. Mednjača (*Armillaria mellea)* (https://first-nature.com) 6
Slika 7. Hrastova mrežasta stjenica (https://stetnici.hr) 7
Slika 8. Tekline na deblu bukve (Pernek i dr., 2011) 8
Slika 9. Geografski položaj GJ Desićevo (https://google.com) 10
Slika 10. Odrezani i površinski sterilizirani uzorci 12
Slika 11. Presadnja svakog micelija uzorka H7 u zasebne Petrijeve zdjelice na PDA hranjivu podlogu 13
Slika 12. Čiste kulture micelija 14
Slika 13. Uređaj za lančanu reakciju polimerazom (PCR) 15
Slika 14. UV transiluminator s kamerom 16
Slika 15. Kromatogram jedne od dobivenih sekvenci micelija slanih u Macrogen na sekvenciranje ... 17
Slika 16. Usporedba obrađene sekvence s postojećima u GenBank bazi podataka upotrebom alata BLAST 17
Slika 17. Micelij gljive *Diaporthe eres* star 67 dana, na PDA hranjivoj podlozi 20
Slika 18. Micelij gljive *Dendrostoma leiphaemia* na PDA hranjivoj podlozi 21

Popis tablica

Tablica 1. Konačne koncentracije pojedinih sastojaka smjese za PCR 14
Tablica 2. Uvjeti lančane reakcije polimerazom 15
Tablica 3. Rezultati DNA analize 18

1. Uvod i cilj istraživanja

1.1. Hrast lužnjak (*Quercus robur* L.) i njegov značaj za šumarstvo u Hrvatskoj

Hrast lužnjak listopadna je vrsta drveća koja doseže 40 (50) metara visine i 2,5 (6) metara prsni promjer. Tamnosive je do tamnosmeđe kore uzdužno i bliže poprečno izbrazdane. Lišće lužnjaka je perasto režnjasto sa 3-6 zaobljenih režnjeva sa svake strane te uhorkaste ili srcaste osnove. Izbojci su bridasti, goli i sjajni, a pupovi jajasti, tupog vrha ili kratko ušiljeni. Ljuske su crvenkasto smeđe, postrani pupovi koso otklonjeni od izbojka. Plod lužnjaka je oraščić odnosno žir koji je do četvrtine ili trećine u kupuli, dozrijeva u jesen prve godine. Zreo žir najčešće je svjetlo smeđe boje sa tamnim uzdužnim prugama, a puni urod žira očekuje se svakih 3-5 godina (Idžojtić, 2013).

Areal lužnjaka je Europa, Kavkaz, sjeverna Afrika i Mala Azija (Slika 1). U Hrvatskoj je autohtona vrsta koja se rasprostranjuje u nizinskim prostorima do 200 m nadmorske visine. Vrsta je jako ovisna o vodi te ju u Hrvatskoj nalazimo na ilovastim i pješčanim tlima u poplavnom području rijeka (Sava, Drava i Dunav), u dolini rijeke Mirne u Istri, ali i na poplavnim krškim područjima (Idžojtić, 2013).



Slika 1. Areal hrasta lužnjaka (Idžojtić, 2013.)

U Hrvatskoj hrast lužnjak tvori dvije temeljne zajednice koje su rasprostranjene u dolinama velikih rijeka, Drava, Dunav, Sava, Kupa i dr. U njima hrast tvori velike šumske komplekse (Lonjsko polje, Spačva, Repaš u Podravini, šume u Donjem Miholjcu te Našicama). U tim kompleksima nalazimo u nizama zajednicu hrasta lužnjaka i velike žutilovke (Genisto elatae-Quercetum roboris) i na višim, gredama, zajednicu hrasta lužnjaka i običnog graba (Carpino betuli-Quercetum roboris) (Slika 2). Zajednicu sa velikom žutilovkom prvi je opisao Ivo Horvat 1938. godine iz snimaka iz Draganićkog luga do spačvanskih šuma kod Vinkovaca. On je tu asocijaciju rastavio na dvije subasocijacije (*caricetosum brizoidis* i *caricetosum remotae*) te je naglasio njenu iznimnu važnost. Druga zajednica je zajednica lužnjaka sa običnim grabom (Carpino betuli-Quercetum roboris) koju je prvi puta opisao Josip Kozarac 1886. godine. Ta je zajednica van dohvata sezonskih poplava, što se vidi prisustvom običnog graba koji ne podnosi stajaću vodu i dugotrajnu zasićenost tla podzemnom vodom, ali u zimskim mjesecima je tlo zasićeno vodom (Vukelić, 2012).



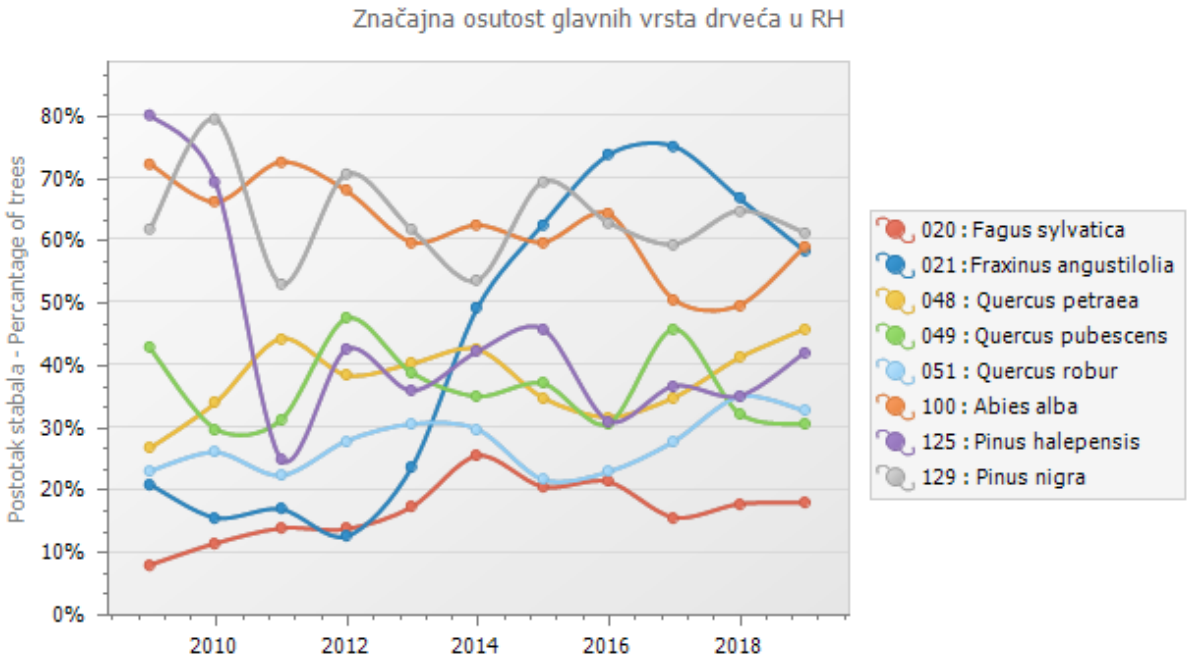
Slika 2. Šuma hrasta lužnjaka sa običnim grabom

U Hrvatskoj se lužnjak javlja i u Istri u dolini rijeke Mirne na području tzv. Motovunske šume. To je reliktna poplavno-nizinska šuma hrasta lužnjaka i poljskog jasena. Iako je

to submediteranska vegetacijska zona zbog blizine rijeke stvorili su se ekološki uvjeti za razvoj povremeno poplavnih šuma sličnih onima u kontinentalnom dijelu Hrvatske. Sastojine hrasta lužnjaka u Hrvatskoj zauzimaju otprilike 11,6% ukupne drvne zalihe. Uzimajući u obzir kvalitetu drva, lakoću obrade i godove podjednake širine lužnjak predstavlja našu najvrjedniju vrstu te su prihodi od prodaje sortimenata značajni. Osim financijske dobiti vrlo je važno napomenuti i općekorisne funkcije lužnjakovih šuma (estetska, zaštitna, rekreacijska, zdravstvena i dr.), najčešće u urbanim sredinama gdje hrast tvori komplekse ljudima pristupačnih šuma (Čavlović i sur., 2014).

1.2. Bolesti i štetnici na hrastu lužnjaku

Hrast lužnjak je kao i svaka vrsta podložna napadu raznih štetnika ili je žrtva promjene stanišnih uvjeta bilo direktno ili indirektno. U Hrvatskoj se oštećenost šumskih sastojina prati preko Međunarodnog programa za procjenu i motrenje zračnog onečišćenja na šume (ICP Forests).



Slika 3. Prikaz kretanja značajne osutosti (< 25% osutosti) krošanja nekih vrsta šumskog drveća u Republici Hrvatskoj za razdoblje od 2009. – 2019. (Potočić i sur., 2019)

U grafičkom prikazu (Slika 3) vidi se kako je osutost hrasta lužnjaka u razdoblju od 2009. – 2017. godine stabilna sa manjim oscilacijama što ukazuje na stabilnost i sveukupno dobro zdravstveno stanje vrste na području cijele Hrvatske, dok je u 2018.

i 2019. godini povećana značajna osutost lužnjaka te iznosi preko 30% (Potočić i sur., 2019).

Posljedice sušenja i oštećenja lužnjaka kao najvrjednije vrste u Hrvatskoj sa gospodarskog stajališta su smanjenje kvalitete sortimenata, povećanje troškova gospodarenja, smanjenje prihoda, remećenje potrajnosti gospodarenja i dr., dok sa ekološkog stajališta to znači stalne promjene u vodenom režimu, narušavanje cijele strukture šumskih kompleksa te trajne promjene u svim stanišnim uvjetima određenog područja (Spaić, 1974).

Kao posljedica klimatskih promjena dolazi do zamočvarenja staništa, ekstremne suše te promjena srednje godišnje temperature. Svi ti čimbenici, kao i mnogi drugi, utječu na pojavu raznih štetnika koji već oslabljene jedinke lako napadaju i uništavaju. Tako oslabljeni ekosustav je podložan ostalim štetnim utjecajima kao što su vjetrolomi i vjetroizvale koji stvaraju uvjete za pojavu patogenih gljiva te se tako zatvara krug (Spaić, 1974).

Kao što je navedeno, u sušenju hrastova sudjeluju mnogi čimbenici, bilo žive ili nežive prirode, a u daljnjem tekstu biti će spomenuti najvažniji organizmi koji u velikoj mjeri oslabljuju strukturu hrastovih šuma.

Gubar glavonja (*Lymantria dispar* L.) jedan je od najvažnijih štetnika na hrastovima u Hrvatskoj, a i u svijetu. To je leptir sa izraženim spolnim dimorfizmom: mužjak mjeri dužinu do 15 mm, a raspon krila do 40 mm, dok je ženka veća, do 3 cm i raspona krila 5-6 cm (Slika 4). Ženka odlaže jaja u velikom broju na koru stabala ili kamenje te ih prekriva dlačicama sa zadka. U jajnom leglu može biti 300-600 jaja dok u progradaciji i preko 1000. Gusjenice izlaze iz jaja na proljeće te se nakon izlijeganja razilaze po drvetu u potrazi za hranom. Brštenje traje oko 8 tjedana, a u progradaciji često uzrokuju golobrst. Stadij kukuljice traje desetak dana, a stadij imaga isto toliko (ovisno o klimatskim prilikama te o kopulaciji leptira) (Hrašovec & Franjević, 2011).



Slika 4. Mužjak i ženka gubara

Hrastova pepelnica (*Mycrosphaera alphitoides* Grif. et Maubl.) najraširenija je bolest naših šuma i napada sve vrste hrastova. Nalazimo je od nizina na lužnjaku do primorja na meduncu i crniki. Kod manjih napada na stablima se ne uočavaju velike promjene no kod napada velikih razmjera može se narušiti struktura drva te ukupni prirast, a kod višegodišnjih jačih napada stabla su podložna napadu drugih gljiva kao što je mednjača (*Armillaria mellea* Karst.).

Prvi simptomi napada mogu se uočiti krajem svibnja i početkom lipnja, a pojavljuju se kao bijele pjegice na vršnim listovima izbojaka koje se s vremenom šire i spajaju te pokrivaju značajnu površinu lista ili čak i zeleni dio izbojka (Slika 5). Veći se napadi obično ne javljaju često, ali mogući su kod pojave kasnih proljetnih mrazova kada hrastovi krenu sa listanjem te se ta prva generacija lista smrzne, a nakon nje stablo potjera drugu. Ta je druga generacija vrlo podložna napadu pošto lišće nije stiglo stvoriti kutikulu koja je pepelnici neprobojna te lako vrši zarazu (Glavaš, 1999).



Slika 5. Hrastova pepelnica (Diminić, 2007)

Mednjača (*Armillaria mellea* /Vahl. et Fr./ Karst) je gljiva koja je utvrđena na svim kontinentima. Napada oko 600 vrsta listača i četinjača, a možemo je naći i na rudnom drvu gdje razvija samo rizomorfe. Plodišta rastu u jesen u velikim busenima, ponekad i pojedinačno (Slika 6). Nalazimo ju na panjevima i na živom drveću pri bazi ili donjem dijelu debla (Glavaš, 1999). Ona na hrastu obično dolazi posljednja u nizu drugih čimbenika sušenja (defolijacija, pepelnica, klimatske promjene i dr.) te uzrokuje propadanje korijena stabala i ubrzava proces odumiranja. Kao patogen koji dolazi iz tla, mjere suzbijanja na većim površinama su gotovo nemoguće te se može kao zaštitnu mjeru jedino pokušati suzbiti prijašnje uzročnike defolijacije i pepelnicu (Harapin & Androić, 1996).



Slika 6. Mednjača (*Armillaria mellea)* (https://first-nature.com)

Hrastova mrežasta stjenica (*Corythucha arcuata* Say 1832.) novi je štetnik hrasta na području Hrvatske (Slika 7). To je kukac koji je autohton u sjevernoj Americi, a na područje Hrvatske je najvjerojatnije došao transportom sortimenata. U Europi prvi put je zabilježena u Italiji 2000-te godine (Piemonte i Lombardia), a ubrzo nakon toga u Turskoj i Švicarskoj. U Hrvatskoj je zamijećena 2013. godine. Utvrdilo se da je zaraza krenula iz odmorišta „Spačva“ na autocesti kod Lipovljana te se ubrzo proširila na ostale dijelove države. Zabilježena je na svim našim hrastovima osim u šumama Istre i Kvarnera (Hrašovec i sur., 2013).



Slika 7. Hrastova mrežasta stjenica (https://stetnici.hr)

Mrežasta stjenica se proširila zbog obilja hrane, nedostatka predatora i činjenice da se njeno prisustvo nije shvaćalo kao velika prijetnja najviše zbog činjenice da morfološki i biološki jako podsjeća na plataninu mrežastu stjenicu (*Corythucha ciliata*) koja, na našim prostorima, obitava već četiri desetljeća te ju platane vrlo dobro podnose. Hrani se sisajući biljne sokove iz lišća pri čemu uzrokuje preuranjenu promjenu boje i žućenje lišća još tijekom ljeta što može uzrokovati pad prirasta i slabljenje napadnutih jedinki. Osim na lužnjaku, hrastova mrežasta stjenica primijećena je još na ostalim hrastovima te i nekim drugim biljnim rodovima (*Q. petraea, Q. pubescens, Q. cerris, Q. rubra, Rubus idaeus, R. ulmifolius, Castanea sativa i Rosa canina*) (Hrašovec i sur., 2013).

***Phytophthora* spp.** je rod u koji spada veliki broj vrsta pseudogljiva koje parazitiraju velik broj biljaka. Njihovim djelovanjem odumiru korijen i kora biljaka što je često povezano sa klimom i ekstremima. Vrste roda *Phytophthora* su pronađene na stotinjak

drvenastih vrsta te se u posljednja dva desetljeća ubrajaju kao značajniji štetnici na šumskom drveću. Iako se *Phytophthora* vrste u većini literature navode kao gljive one zapravo spadaju u *Oomycota,* pseudogljive, koje su filogenetski bliže algama.



Slika 8. Tekline na deblu bukve (Pernek i sur., 2011)

Spore nalazimo u tlu gdje mogu preživjeti više godina do pojave optimalnih uvjeta (vlaga, temperatura iznad 10 °C). Kada dospiju u drvo hife se šire koncentrično, a nakon iscrpljivanja svih hranjiva stvaraju se trajne spore koje ulaze u tlo raspadanjem drvnog materijala. Tipični simptom na hrastu je odumiranje korijenja. U kontroliranim uvjetima na jednogodišnjim sadnicama primijećeno je odumiranje 35-50% finog korijenja u razdoblju od četiri mjeseca. Manja oštećenja (10-23 mm nakon 3 mjeseca) dobivena su prilikom unašanja patogena u stabljiku mladih hrastova lužnjaka (Jung i sur., 1999). Često se odumiranje krivo pripisuje drugim uzročnicima zbog specifičnog ciklusa roda *Phytophthora* koji se odvija u tlu i zbog naseljavanja sekundarnih štetnika na oslabljena stabla. Jedan od značajnih simptoma roda *Phytophthora* su tekline (Slika 8), tamni sokovi koji se javljaju na kori stabla u obliku nepravilnih krugova. Nastaju zbog pritiska plinova u deblu prouzročenog aktivnošću ovih pseudogljiva ili u nekim slučajevima dijeljenjem bakterija ispod kore. Ostali simptomi napada mogu se uočiti u većem udjelu mrtvog granja, odumiranju kore, prorijeđenosti krošnje i sl. (Pernek i sur., 2011).

1.3. Cilj istraživanja

Hrast lužnjak kao naša najvrjednija vrsta ima značajnu ulogu u šumarstvu te je zaštita te vrste od biotskih (autohtonih i alohtonih) te abiotskih čimbenika vrlo važna u normalnom funkcioniranju prirodnog ekosustava. Među značajnim problemima u ukupnom zdravlju jedinki predstavljaju i bolesti kore koje uzrokuju sušenja zbog remećenja normalnog kolanja biljnih sokova (Glavaš, 1999).

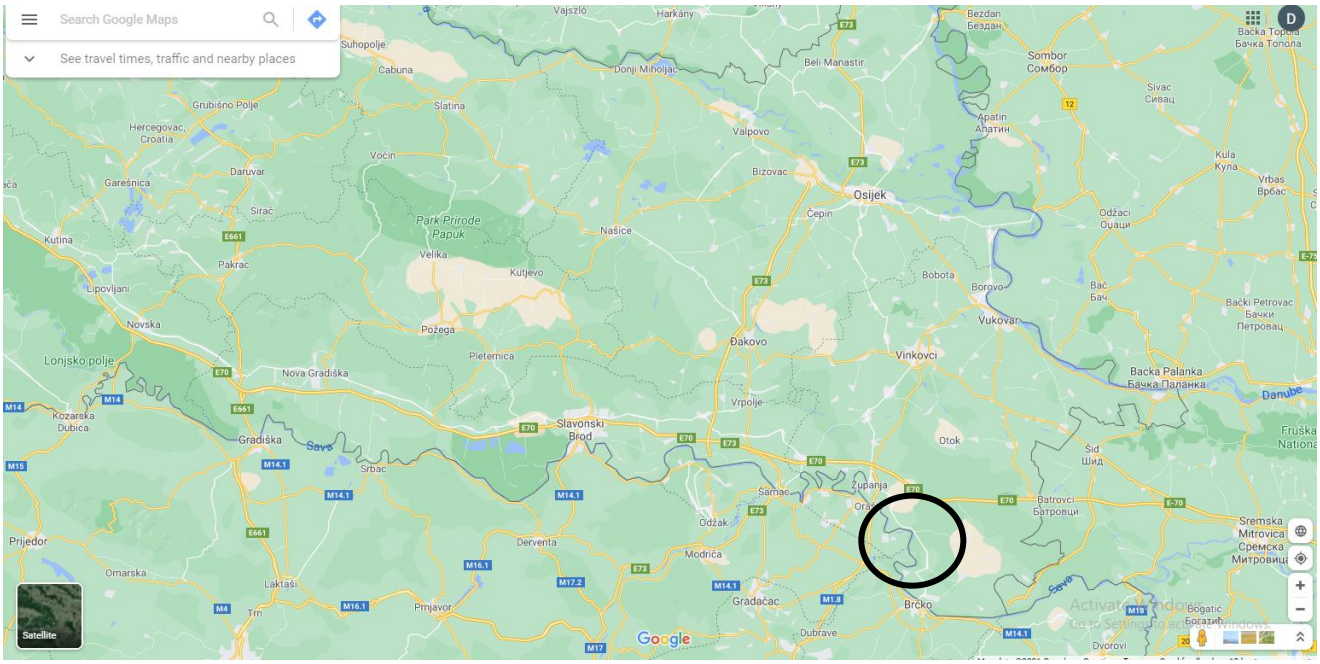
U GJ Desićevo u šumariji Gunja je 2020. godine zabilježeno odumiranje pomlatka hrasta lužnjaka na velikim površinama. Na sadnicama je ustanovljeno sušenje od vrha prema bazi sa jasno definiranom granicom između zdravog i simptomatičnog dijela biljke te je pretpostavka da je uzrok tome sušenju zaraza patogenim gljivama.
Cilj istraživanja je bio ustanoviti o kojim se patogenim vrstama radi izolacijom micelija na hranjive podloge te korištenjem molekularnih metoda za njihovu identifikaciju.
Samo utvrđivanje prisutnosti potencijalno štetnih organizama u biljnom tkivu od velike je važnosti za odabir mjera zaštite koje mogu spasiti stablo ili sastojinu od odumiranja ili slabljenja. Rezultati mogu biti korišteni i u budućem gospodarenju na područjima gdje su ti patogeni utvrđeni.

2. Materijali i metode istraživanja

2.1. Područje istraživanja

Gospodarska jedinica Desićevo smještena je u jugozapadnom dijelu Spačvanskog bazena. Zauzima prostor od 18°46'47"-18°51'51' istočne zemljopisne dužine do 44°55'53"-45°00'37" sjeverne zemljopisne širine (Slika 9). Gospodarska jedinica se nalazi na području općine Drenovci i općine Bošnjaci u Vukovarsko-srijemskoj županiji. Gospodarska jedinica Desićevo je uz gospodarske jedinice Trizlovi – Rastovo, Savski lugovi i dio gospodarske jedinice Sava, Slavonski Brod – Račinovci jedna od četiri jedinice u šumariji Gunja koja je u sastavu uprave šuma podružnice Vinkovci.

Veliki dio gospodarske jedinice predstavlja cjeloviti šumski kompleks dok je manji dio (46,75 ha ili 1,8 % ukupne površine) odvojen vodozaštitnim nasipom te se nalazi između korita rijeke Save i vodozaštitnog nasipa (inundacijski pojas). Od te površine 46,12 ha je obraslo zemljište te pošto su ove sastojine prema Zakonu o vodama, javno vodno dobro od interesa Republike Hrvatske, svrstane su u zaštitne šume.



Slika 9. Geografski položaj GJ Desićevo (https://google.com)

Gospodarska jedinica Desićevo dobiva današnji oblik i površinu 1962. godine, a do tada je bila pod raznim rukovodstvima. Među prvim zapisima pojavljuje se nakon stvaranja Vojne krajine koju je Austro – ugarska monarhija formirala za zaštitu od Turaka 1702. godine. Nakon ukidanja Vojne krajine 1871-e te su šume podijeljene na dva, po vrijednosti, jednaka dijela gdje su šume bliže naseljima predane krajiškim imovnim općinama, a ostale šume su pripale državi. Imovne općine su se zadržale do 1941. kada ih tadašnja vlast ukida i osniva Ravnateljstvo šuma koje je gospodarilo tim šumama (Anon., 2017).

2.2. Uzimanje uzoraka na terenu

Uzorkovanje je izvršeno u GJ Desićevo u odsjeku 42a gdje je na površini od 66,36 ha primijećeno sušenje hrastovog pomlatka u dobi od šest godina. Odumiranje je uočeno od vrha prema bazi sa jasno definiranom granicom između zdravog i simptomatičnog dijela biljke, a simptomi sušenja su prisutni na cijeloj površini. Zamijećena je tipična bolest kore te su uzorci biljnog materijala uzeti ravnomjerno sa cijele zaražene površine vrtnim škarama. Alat je nakon svakog uzorkovanja dezinficiran, a uzorci su spremljeni u zasebne vrećice te označeni rednim brojem. Svaki je uzorak sadržavao zdravi i simptomatični dio što je važno za pravilno istraživanje.

Tako spremljeni uzorci pohranjeni su u rashladnu torbu te prevezeni na daljnju obradu u Laboratorij za patologiju drveća Zavoda za zaštitu šuma i lovno gospodarenje na Šumarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

2.3. Izolacija patogena iz biljnog tkiva na hranjivu podlogu



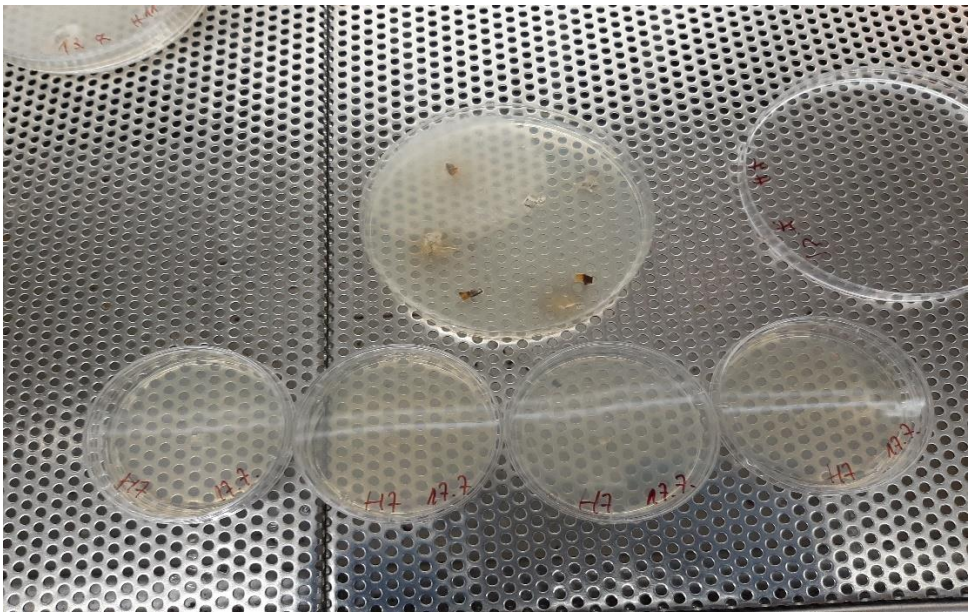
Slika 10. Odrezani i površinski sterilizirani uzorci

Dopremljeni uzorci skraćeni su vrtnim škarama radi lakšeg rukovanja te su stavljeni u laminarni mikrobiološki kabinet za rad u atmosferi čistog zraka (u daljnjem tekstu: laminarni kabinet). U laminarnom kabinetu uzorci su površinski sterilizirani uranjanjem u 96%-tni etanol na jednu minutu, a nakon toga su uronjeni u sterilnu destiliranu vodu i posušeni na papirnatom ručniku (Slika 10). Sve je odrađeno u laminarnom kabinetu zbog sprečavanja kontaminacije uzoraka. Kabinet radi na principu cirkulacije zraka te na taj način sprečava ulazak čestica u radni prostor.

Nakon sušenja uzoraka uzet je komadić simptomatičnog kao i zdravog tkiva sa granice širenja zaraze sterilnim skalpelom i pincetom, te su četiri komadića tkiva po jednom uzorku biljke stavljeni u Petrijevu zdjelicu na PDA hranjivu podlogu (Potato Dextrose Agar, ThermoFisher Scientific, SAD) kojoj je pridodan antibiotik streptomicin (200 mg/L, Sigma-Aldrich, USA).

Pincete i skalpeli su nakon svakog uzorkovanja sterilizirani uranjanjem u 96%-tni etanol te su izloženi otvorenom plamenu do isušivanja, dok je radna daska prskana etanolom i brisana papirnatim ubrusom između svakog uzorka.

Svaka Petrijeva zdjelica označena je oznakom uzorka (H1, H2,…) i datumom uzorkovanja te su stavljene u vrećicu i spremljene u komoru za rast u tamu na temperaturu od 19-21 °C. Praćen je rast micelija te je nakon 2 tjedna odrađena presadnja micelija u zasebne Petrijeve zdjelice na PDA podlogu kako bi dobili čiste kulture (Slika 11). Miceliji za presadnju su uzimani sa rubnih dijelova.



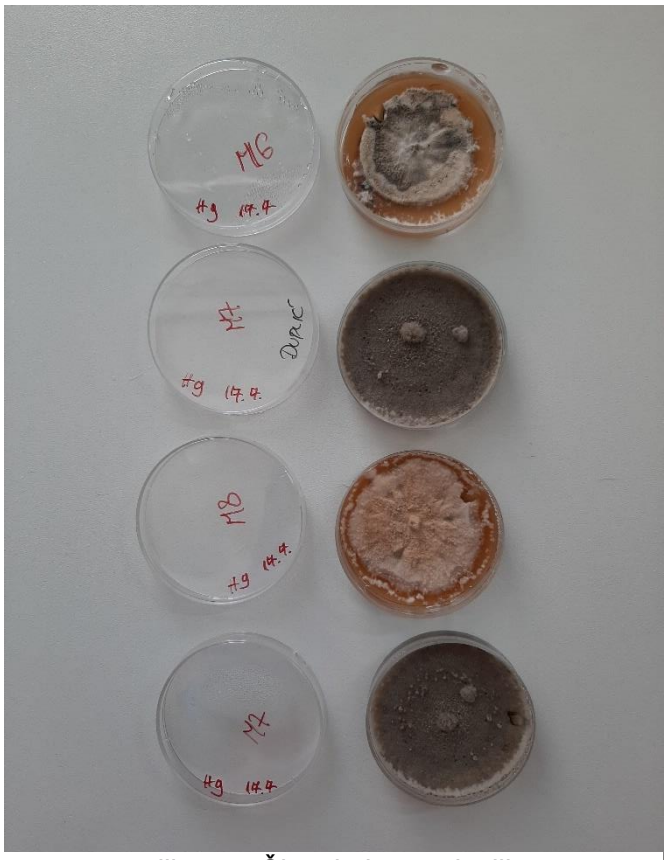
Slika 11. Presadnja svakog micelija uzorka H7 u zasebne Petrijeve zdjelice na PDA hranjivu podlogu

2.4. Identifikacija taksona izoliranih gljiva molekularnim metodama

Dobivene čiste kulture micelija su na temelju morfoloških značajki promatranih golim okom grupirane u morfotipove (Slika 12). Promatrane morfološke značajke su uključivale boju i teksturu micelija, obojenje hranjive podloge, boju na poleđini Petrijeve zdjelice, brzinu rasta. Za svaki utvrđeni morfotip je odabran jedan reprezentativni izolat za identifikaciju vrste. Izolacija DNA iz micelija je vršena metodom isoljavanja (Miller et al., 1988) s modifikacijama (Kranjec, 2017).

Miceliji su za potrebe izolacije DNK uzgojeni u MEB (Malt Extract Broth) tekućoj hranjivoj podlozi u mikroepruvetama (2 ml). Nakon tjedan dana rasta, mikroepruvete s micelijima su podvrgnute centrifugiranju (Eppendorf AG 5804 R laboratorijska centrifuga) na 15000×g u trajanju od 15 min, nakon čega je hranjiva podloga odbačena (otpipetirana), a miceliju preostalom u mikroepruveti je dodano 300 µl pufera za lizu (20 mM Tris, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10 % SDS, pH 8) i 150 µl natrijevog acetata (NaAc, 3M). Mikroperuvete su centrifugirane 5 min na 15000×g, nakon čega je supernatant pipetiran u novu mikroperuvetu u koju je potom dodan jednak volumen izopropanola (250 µl). Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi u trajanju od 5 min, mikroepruvete su ponovno centrifugirane na 15000×g u trajanju od 20 min. Potom je

supernatant pažljivo odbačen izlijevanjem a u mikroperuvete dodano 500 µl ledeno hladnog 70 % etanola. Mikroepruvete su podvrgnute centrifugiranju na 15000×g na 3 min, nakon čega je supernatant (etanol) otpipetiran, a talog DNK ostavljen na sobnoj temperaturi kako bi etanol u potpunosti ishlapio. Uzorcima je potom dodano 50 µl TE pufera te su pohranjeni u hladnjak na 4 °C do daljnje uporabe.



Slika 12. Čiste kulture micelija

U lančanoj reakciji polimerazom (PCR) je umnažana ITS regija izolirane genomske DNA (Schoch i sur., 2012) korištenjem početnica ITS1-F i ITS4 (Gardes i Bruns, 1993; White i sur., 1990) (Slika 13). Konačne koncentracije pojedinih sastojaka smjese za PCR (Tablica 1) te uvjeti reakcije (Tablica 2) su određeni prema Bakys i sur. (2013).

Tablica 1. Konačne koncentracije pojedinih sastojaka smjese za PCR

Sastojak*	Konačna koncentracija za reakciju
Taq DNA polimeraza	1 U/50 µl
početnica ITS 1	0,2 µM
početnica ITS 4	0,2 µM
dNTP smjesa	0,2 mM
$MgCl_2$	2,75 mM
pufer za PCR	1 x
sterilna H_2O	do volumena 50 µl
DNA kalup	3-90 ng/µl

Tablica 2. Uvjeti lančane reakcije polimerazom

Početna denaturacija	35 ciklusa			Završno produljivanje lanca DNA
	Denaturacija	Sparivanje početnica	Produljivanje lanca DNA	
5 min na 95 °C	30s na 95°C	45s na 50°C	90 s na 72 °C	5 min na 72 °C

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



Slika 13. Uređaj za lančanu reakciju polimerazom (PCR)

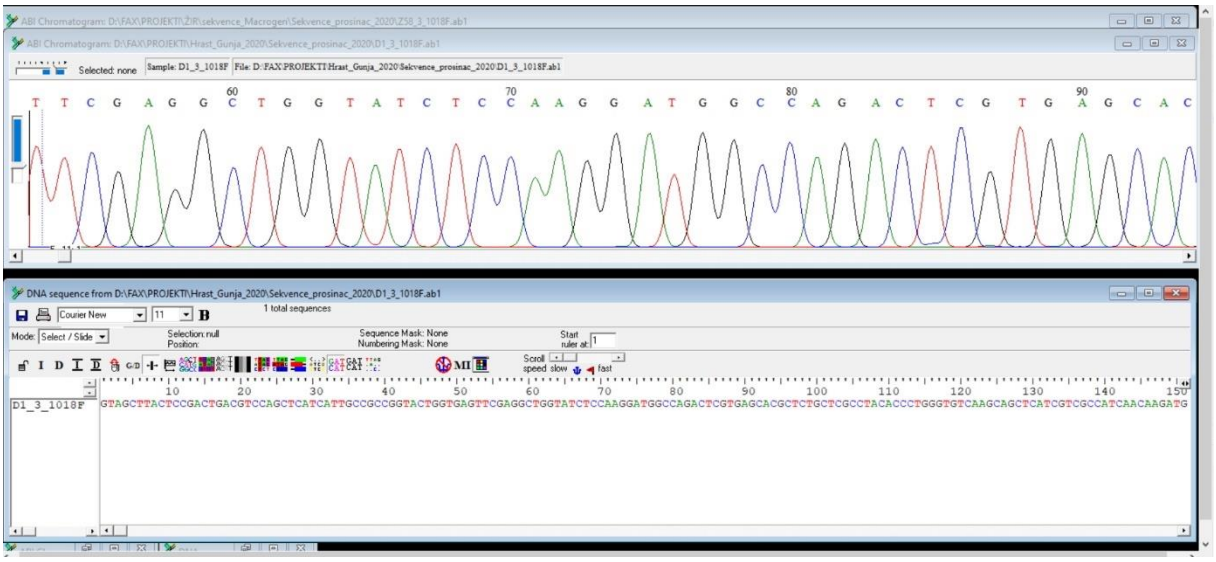
Specifičnost, duljina (pb) te približna koncentracija dobivenih PCR produkata su provjerene elektroforezom u 1,5 % agaroznom gelu (0,375 g agaroze u 25 ml 1x TBE (89 mM Tris-borat, 2 mM EDTA) pufera, Lonza Rockland, SAD) pri naponu od 55 V te u trajanju od 90 minuta. U gel se prethodno dodavala boja za vizualizaciju nukleinskih kiselina GelStar Nucleic Acid Gel Stain (Lonza Rockland, SAD) konačne koncentracije 1x. U jažice gela je nanošeno po 1 µl svakog PCR produkta pomiješanog s 4 µl sterilne destilirane vode (razrjeđenje zbog visoke koncentracije dobivenih produkata) te 1 µl pufera za nanošenje uzoraka (6x DNA Loading Buffer, TransGen Biotech, Kina). Tijekom svake izvođene elektroforeze je u jednu od jažica nanošen molekularni marker poznate veličine (100 bp DNA Ladder, TransGen Biotech, Kina) radi procjene duljine i koncentracije PCR produkata. Nakon završene elektroforeze su PCR produkti na gelu vizualizirani te fotografirani pomoću UV transiluminatora s kamerom (Bio-Imaging Systems DNR, MiniBIS Pro) (Slika 14) te računalnog programa GelCapture.

Izolacija genomske DNA iz odabranih čistih kultura micelija te umnažanje ciljanih sekvenci (ITS regije) u lančanoj reakciji polimerazom (PCR) su izvršeni u Molekularno-biološkom laboratoriju Zavoda za šumarsku genetiku, dendrologiju i botaniku na Šumarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Dobiveni nepročišćeni PCR produkti su slani u Macrogen Inc. (Amsterdam, Nizozemska) na sekvenciranje.



Slika 14. UV transiluminator s kamerom

Kromatogrami dobiveni sekvenciranjem su provjereni i obrađeni u računalnom programu BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.2.5 (Slika 15) (Hall, 1999). Izolati su identificirani usporedbom obrađenih sekvenci s postojećima u bazi gena NCBI GenBank primjenom algoritma BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Slika 15) (Altschul i sur., 1990). Za identifikaciju na razini vrste su u obzir uzimane sekvence s podudarnošću od najmanje 98 % na najmanje 80 % duljine ispitivane sekvence, dok su one s podudarnošću od 94 – 97 % na također najmanje 80 % duljine ispitivane sekvence korištene za identifikaciju na razini roda ili druge više taksonomske jedinice (Bakys i sur. 2009a, Bakys i sur. 2009b, Bakys i sur. 2011). Znanstveni nazivi taksona su preuzeti s mrežne stranice www.indexfungorum.org.



Slika 15. Kromatogram jedne od dobivenih sekvenci micelija slanih u Macrogen na sekvenciranje



Slika 16. Usporedba obrađene sekvence s postojećima u GenBank bazi podataka upotrebom alata BLAST

3. Rezultati istraživanja

U ovom poglavlju biti će prikazani rezultati dobiveni u prijašnjim fazama rada. Istraživanje je obuhvatilo 13 uzoraka sadnica hrasta lužnjaka. Iz svake su uzeta četiri komadića tkiva sa simptomima zaraze. Sveukupno je dobiveno 48 izolata micelija koji su svrstani u 17 morfotipova na kojima je obavljena DNK analiza te je dokazano 15 različitih taksona gljiva sa podudarnošću sekvenci od 97,75 – 100 % (Tablica 3).

Tablica 3. Rezultati DNK analize

Oznaka uzorka	Oznaka morfotipa	Vrsta najveće podudarnosti sekvence prema BLAST algoritmu	Identifikacijski broj podudarajuće sekvence u NCBI GenBank	Pokrivenost sekvence %	Podudarnost sekvenci %
H1	G1	*Diaporthe eres*	KP903620.1	97	99,82
H2		*Diaporthe eres*	KP903620.1	97	100
H13		*Diaporthe eres*	MT561403.1	97	99,82
H2	G3	*Monochaetia* sp.	NR_148179.1	95	98,45
H12 (1)		*Paraphaeosphaeria sporulosa/neglecta*	MF509754.1 / JX496164.1	98	99,49
H10	G5	*Pyrenochaeta* sp.	MK100233.1	96	99,81
H9	G6	*Xylariales* sp.	AB255288.1	97	97,75
H9	G7	*Pyrenochaeta* sp.	MK100233.1	96	99,81
H9	G8	*Xylariales* sp.	AB255288.1	97	97,75
H2	G9	*Alternaria alternata /tenuissima*	MT174141.1 / KY315929.1	97	100
H4 (1)	G10	*Didymellaceae* sp.	MT453292.1	97	99,81
H4 (2)	G11	*Sordaria fimicola*	MH858489.1	97	99,82
H4 (2)	G12	*Alternaria infectoria / caespitosa*	MN534845.1 / MH861255.1	97	99,83
H6	G13	*Cladosporium cladosporioides*	LT603044.1	97	100
H7	G14	*Dendrostoma leiphaemia*	MN447231.1	97	99,67
H7	G15	*Paraconiothyrium brasiliense*	JX496058.1	97	99,83
H8	G16	*Dendrostoma leiphaemia*	MN447231.1	97	99,67

Oznaka uzorka	Oznaka morfotipa	Vrsta najveće podudarnosti sekvence prema BLAST algoritmu	Identifikacijski broj podudarajuće sekvence u NCBI GenBank	Pokrivenost sekvence %	Podudarnost sekvenci %
H8	G17	*Dendrostoma leiphaemia*	MN447231.1	97	99,83
H11	G18	*Valsa ceratophora*	MH862834.1	97	99,67
H11	G19	*Monochaetia* sp.	NR_148179.1	95	99,25

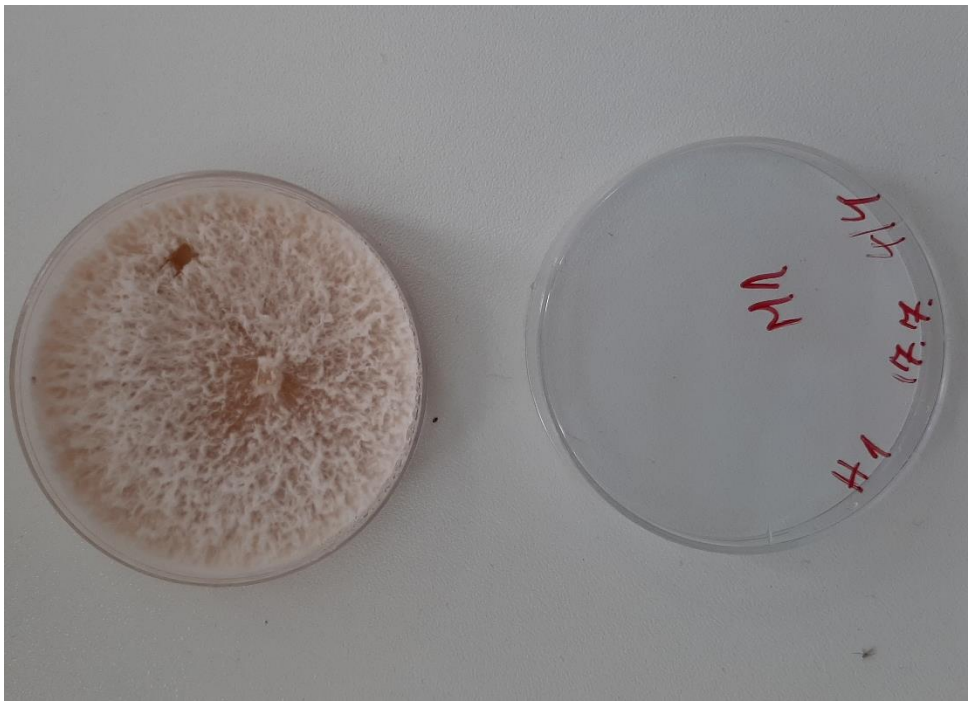
Od taksona koji su utvrđeni DNK analizom najčešći su *Diaporthe eres* (utvrđen na 3 od 13 uzoraka) te *Monochaetia* sp., *Pyrenochaeta* sp. i *Dendrostoma leiphaemia* (svaki utvrđeni na 2 od 13 uzoraka). Svi ostali taksoni javljaju se po jednom na preostalim uzorcima.

Prosječno su po uzorku dobivena 3 micelija.

3.1. Utvrđeni taksoni gljiva

- ***Diaporthe eres*** Nitschke, 1870 (Slika 17) patogena je gljiva koja napada velik broj zeljastih i drvenastih vrsta. U Hrvatskoj je ustanovljena na američkoj borovnici (*Vaccinium corimbosum)* gdje uzrokuje rak rane i sušenja izdanaka (Ivić et al., 2018) kao i na deblu vinove loze na području cijele države (Kaliterna et al., 2012).

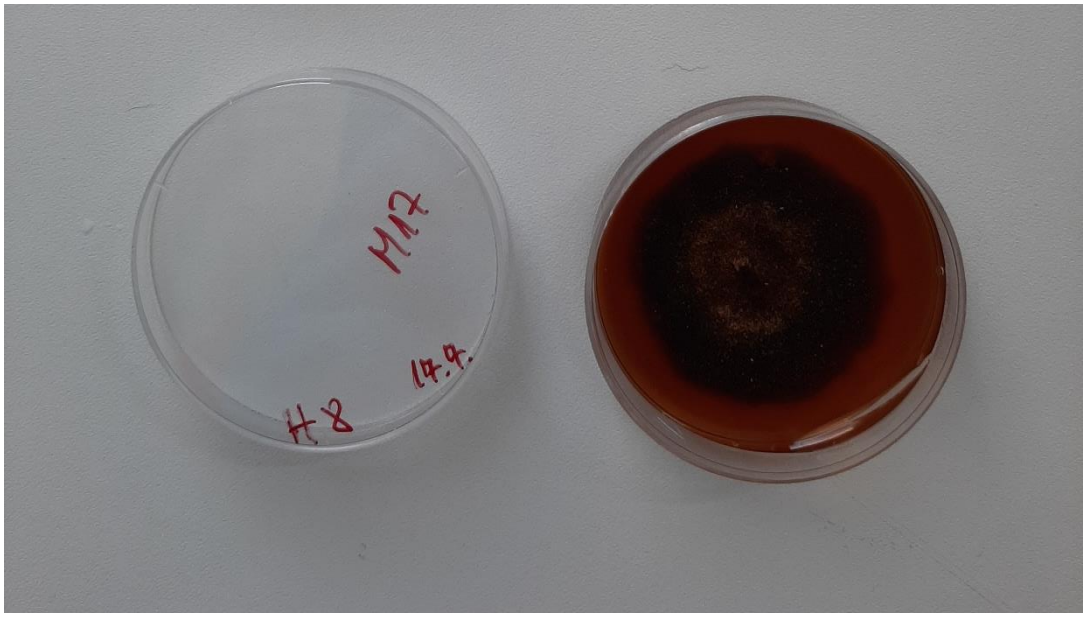
  Wehmeyer (1933) je vrstu *D. eres* definirao kao kompleks gljiva na temelju morfoloških značajki no to nije dalje istraživano do pojave molekularnih metoda za određivanje vrste. U istraživanju obavljenom 2014. godine utvrđeno je da je *D. eres* oportunistički parazit koji napada velik broj biljnih vrsta te iz tog razloga se genetski razlikuje ovisno na kojoj se vrsti i u kojem se području nalazi (Udayanga et al., 2014).



Slika 17. Micelij gljive *Diaporthe eres* star 67 dana, na PDA hranjivoj podlozi

- ***Pyrenochaeta sp.* –** ovaj je rod utvrđen na 2 uzorka, a zarazu najčešće vrši na korijenu biljke domaćina. Unutar roda postoji mnogo vrsta koje su bezopasne, a neke od poznatih parazita su: *Pyrenochaeta romeroi, P. lycopersici, P. terrestris* i druge. Simptomi zaraze mogu se pronaći i na lišću, a patogene vrste svojim djelovanjem uzrokuju propadanje korijena što uzrokuje smanjen rast domaćina. Simptomi na lišću mogu biti žućenje i smeđenje od ruba prema sredini, a gljive u biljku ulaze preko rana. Kod nas nisu zabilježene štete na glavnim vrstama drveća, dok na riži može uzrokovati sušenja (Nishio & Kusano, 1979).
- ***Dendrostoma leiphaemia* –** ova se vrsta lako prepozna po primjetnim ektostromatskim diskovima, širokim kupolastim ostiolarnim vratovima i širokim višegutulastim askosporama. U Hrvatskoj nisu primijećene veće štete od ovog parazita (Jaklitsch & Voglmayr, 2019) (Slika 18).

  Rod *Dendrostoma* je nedavno uveden kao fitopatogeni rod koji uzrokuje rak rane na raznim drvenastim vrstama u svijetu kao što su *Malus spectabilis, Osmanthus fragrans* i *Quercus acutissima.* Naknadno, *Dendrostoma leiphaemia* na hrastovima se analizom sekvenci izdvojila iz roda *Amphiporthe* (Jiang et al., 2019)



Slika 18. Micelij gljive *Dendrostoma leiphaemia* na PDA hranjivoj podlozi

- ***Sordaria fimicola* –** najčešće se nalazi na voćkama i ukrasnom drveću, a za hrvatsko šumarstvo nije zabilježena kao uzročnik sušenja. Nalazi se u kori, drvu gdje uzrokuje smeđenje i u lišću na kojem se primjećuje pjegavost. Miceliji te gljive pronađeni su u biljnoj biomasi no glavni način rasprostiranja je preko izmeta biljojeda (Ivanová, 2015).

4. Rasprava

U ovom se istraživanju obuhvatilo 13 uzoraka simptomatičnih biljaka hrasta lužnjaka u cilju pronalaženja patogenih gljiva te njihove potencijalne uloge u samom odumiranju. Istraživanje se provelo na velikoj pomladnoj površini sa ravnomjerno uzetim uzorcima simptomatičnih sadnica, kod kojih je zabilježeno odumiranje od vrha glavnog izbojka, sa jasno izraženom granicom između odumrlog i zdravog tkiva.

U navedenom istraživanju zabilježeno je 15 vrsta gljiva što ukazuje na veliku prisutnost ovih organizama u biljnom tkivu. Većina identificiranih gljiva pojavila se samo na jednom uzorku/sadnici, dok je vrsta *Diaporthe eres* pronađena na 3 od 13 uzorkovanih sadnica, a vrste *Monochaetia sp., Pyrenochaeta sp.,* i *Dendrostoma leiphaemia* pronađene su na 2 od 13 sadnica što može ukazivati na njihovu direktnu ili indirektnu ulogu u sušenju hrasta lužnjaka na istraživanom području. Vrsta *Diaporthe eres* zabilježena je kao značajni patogen na poljoprivrednim kulturama u Francuskoj (Bastide i sur., 2017), dok je u Hrvatskoj značajnije štete pravila na kulturama borovnice i vinove loze (Ivić i sur ., 2018; Kaliterna i sur., 2012), a na hrastu i ostalom šumskom drveću do sada nije zabilježena kao zamjetni patogen. Kada se nađe na voćkama nerijetko tvori rak rane na kori drveta dok na poljoprivrednim zeljastim biljkama često izaziva triangularna sušenja cvata, sušenje stabljike od cvata prema korijenu i crne pjege na stabljici (Bastide i sur., 2017). Pretpostavka je da je u našem slučaju gljiva samo oportunistički parazit, tj. da dolazi samo kao sekundarni čimbenik koji se progresivno širi u sastojini smanjenog vitaliteta zbog različitih biotskih ili abiotskih čimbenika no isto tako može biti slučaj da je pojavljivanje uzročnika bolesti utjecalo neposredno na zdravstveno stanje mlade sastojine i uzrokovalo sušenje

Za konačnu potvrdu uzročnika sušenja potrebno je izvršiti testiranje patogenosti gljive, njenom inokulacijom u zdrave sadnice uz praćenje simptoma. Ukoliko se ponovno pojave simptomi istovjetni onima zabilježenim na terenu, potrebno je ponovno izolirati gljivu iz simptomatičnog tkiva te DNK analizom potvrditi kako se radi o istoj vrsti, čime bi Kochovi postulati bili zadovoljeni i njena patogenost dokazana. U testu patogenosti bi bilo moguće utvrditi i koliko vanjski čimbenici utječu na razinu zaraze, izlaganjem određenog broja sadnica raznim stresovima, primjerice ne zalijevati ih (stvaranje uvjeta suše) ili ih pretjerano zalijevati (uvjeti poplave). Na taj način bi se moglo utvrditi je li

Diaporthe eres primarni patogen ili je oportunistički parazit koji se u biljkama širi tek nakon pada njihova vitaliteta uzrokovanog nekim drugim stresnim čimbenikom.

U ovom istraživanju je pronađen relativno veliki broj gljiva u odnosu na količinu uzorkovanog simptomatičnog biljnog tkiva, što može ukazivati veću brojnost potencijalnih patogena na tom prostoru, ali je moguće i posljedica tanke kore mladih biljčica u koju lakše mogu prodrijeti razni organizmi. Veći broj prisutnih vrsta ukazuje i na veću opasnost njihovog širenja kao oportunističkih patogena ako dođe do pada vitaliteta biljke nakon izlaganja drugim negativnim biotskim ili abiotskim čimbenicima na tom području. Uz navedene vrste gljiva identificirane su još: *Monochaetia sp., Paraphaeosphaeria sporulosa/neglecta, Xylariales sp., Alternaria alternata/tenuissima, Didymellaceae sp., Alternaria infectoria/caespitosa, Cladosporium cladosporioides Paracociothyrium brasiliense, Valsa ceratophora.* U ovom radu nije za sve gljive raspravljena njihova moguća uloga zbog nedostatka adekvatne literature za svaku vrstu posebno ili zbog manje važnosti pojedine vrste u sušenju.

U gospodarskoj jedinici Desićevo moguće je primijeniti neke od metoda zaštite od patogena tretiranjem fungicidima pomoću zrakoplova, premda se po trenutnoj zakonskoj regulativi avio tretiranje dozvoljava samo u iznimnim situacijama, ili traktorskim prskalicama zbog same veličine površine (66ha) što ujedno i opravdava troškove materijala i rada.

Kako se u ovom istraživanju radi o simptomima u drvu i kori vjerojatnost je da bi uporaba fungicida kurativno djelovala na već zaražene biljke bila mala s obzirom na smanjenu učinkovitost sistemičnih fungicidi i na upitnost translokacije u stanicama drva (ksilemu), a isto tako zbog moguće prisutnosti gljiva u zdravom tkivu biljaka kao endofita. Osim toga, istraživanjem je potrebno isto tako utvrditi preko kojeg organa dolazi do zaraza te sukladno tome odabrati koji bi se dijelovi biljke eventualno tretirali i u kojem razdoblju.

U slučaju GJ Desićevo najadekvatnije bi bilo ukloniti biljke na kojima se uočavaju simptomi sušenja i plodišta gljive na odumrlim dijelovima, a nastale progale popuniti novim sadnicama. Po pitanju daljnjeg gospodarenja potrebno je izvršiti spomenuta istraživanja o slučaju zaraze uslijed pada vitaliteta uzrokovanim raznim čimbenicima (abiotskim ili biotskim) te ukoliko se utvrdi da li je za veće sušenje uzrok primjerice duže stajaća voda, sukladno tome poduzele bi se adekvatne mjere.

5. Zaključak

U GJ Desićevo na simptomatičnim sadnicama utvrđena je gljiva *Diaporthe eres* za koju se u literaturi navodi da je patogen te je pretpostavka kako je imala ulogu u odumiranju mladih biljaka u sastojini. Za potvrdu pretpostavke potrebno je izraditi daljnja istraživanja patogenosti u kojima bi se potvrdio uzročnik i njegov način zaraze na način da se u zdrave sadnice izvrši inokulacija istog patogena. Iz tih biljaka potrebno je naknadno izolirati DNK gljive te ispuniti Kochove postulate koji potvrđuju je li gljiva *D. eres* prouzrokovala sušenje.

Istim se istraživanjem treba utvrditi otpornost sadnica hrasta lužnjaka na spomenutu gljivu na način da se usporedi uspješnost zaraze tako da se na određeni broj biljaka podvrgne određenom tipu stresa koji bi u prirodnim uvjetima mogao smanjiti vitalitet i ukupnu otpornost biljaka na zarazu. Primjerice dio biljaka može se izloži uvjetima suše, dio biljaka višku vode, a jedan dio optimalnim uvjetima za rast i razvoj. Usporedbom dobivenih rezultata može se sa sigurnošću odrediti koja je vjerojatnost većeg pojavljivanja zaraze na određenim skupinama te sukladno tome primijeniti zahvate mjere zaštite na terenu.

Od velike važnosti je držati se šumarske struke i provoditi gospodarenje po pravilima i osnovi gospodarenja. U operativi se često suočavamo sa uvjetima koji pogoduju raznim štetnim čimbenicima za biljke te u tim situacijama treba pravovremeno djelovati u svrhu očuvanja sastojine i ekosustava. Potrebno je voditi brigu o svim vrstama drveća, a ovo i slična istraživanja pomažu u očuvanju raznolikosti biljnih i životinjskih vrsta na području Republike Hrvatske.

6. Literatura

Anonymus. (2017). *SAŽETAK OPISA ŠUMA GOSPODARSKA JEDINICA DESIĆEVO*. *074*.

Bakys, R. (2013). *Dieback of Fraxinus excelsior in the Baltic Sea region: associated fungi, their pathogenicity and implications for silviculture*.

Bastide, F., Sérandat, I., Gombert, J., Laurent, E., Morel, E., Kolopp, J., Guillermin, P. L., Hamon, B., Simoneau, P., Berruyer, R., & Poupard, P. (2017). Characterization of fungal pathogens (Diaporthe angelicae and D. eres) responsible for umbel browning and stem necrosis on carrot in France. *Plant Pathology*, *66*(2), 239–253. https://doi.org/10.1111/ppa.12570

Čavlović, J., Teslak, K., & Beljan, K. (2014). The effects of different stand regeneration planning on management and pedunculate oak forest development - A small size management class case study [Učinci različitih pristupa planiranja obnove sastojina na gospodarenje i razvoj šume hrasta lužnjaka - Pr. *Sumarski List*, *138*(3–4), 123–134. https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84901387347&partnerID=40&md5=153ab0fa94c868b9a421b48e220777a1

Glavaš, M. (1999). *Gljivicne bolesti sumskog drveca*. Sveučilište u Zagrebu.

Harapin, M., & Androić, M. (1996). Sušenje i zaštita šuma hrasta lužnjaka. In *Hrast lužnjak u Hrvatskoj* (pp. 227–256).

Hrašovec, B., & Franjević, M. (2011). *Šumarska entomologija*.

Hrašovec, B., Posaric, D., Lukić, I., & Pernek, M. (2013). Prvi nalaz hrastove mrežaste stjenice (Corythucha arcuata) u Hrvatskoj. *Sumarski List*, *137*(9–10), 499–503.

Idžojtić, M. (2013). *Dendrologija-cvijet, češer, plod, sjeme*. Sveučilište u Zagrebu.

Ivanová, H. (2015). Sordaria fimicola (Ascomycota, sordariales) on acer palmatum. *Folia Oecologica*, *42*(1), 67–71.

Ivić, D., Novak, A., & Pilipović, P. (2018). *Diaporthe eres Nitschke IS THE ONLY Diaporthe SPECIES FOUND ON BLUEBERRY IN CROATIA*. *32*(2), 23–30.

Jaklitsch, W. M., & Voglmayr, H. (2019). European species of dendrostoma (Diaporthales). *MycoKeys*, *59*, 1–26. https://doi.org/10.3897/mycokeys.59.37966

Jiang, N., Fan, X. L., Crous, P. W., & Tian, C. M. (2019). Species of Dendrostoma (Erythrogloeaceae, Diaporthales) associated with chestnut and oak canker diseases in China. *MycoKeys*, *48*, 67–96.

https://doi.org/10.3897/mycokeys.48.31715

Jung, T., Cooke, D., Blaschke, H., Duncan, J. M., & Oßwald, W. (1999). *Phytophthora quercina*. *103*(7), 785–798.

Kaliterna, J., Miličević, T., & Cvjetković, B. (2012). Grapevine trunk diseases associated with fungi from the Diaporthaceae family in Croatian vineyards. *Arhiv Za Higijenu Rada i Toksikologiju*, *63*(4), 471–479. https://doi.org/10.2478/10004-1254-63-2012-2226

Kranjec, J. (2017). *Uloga gljiva i gljivama sličnih organizama u odumiranju poljskoga jasena (Fraxinus angustifolia Vahl) u posavskim nizinskim šumama u Republici Hrvatskoj*. 161.

Miller, S. A., Dykes, D., & Polesky, H. F. (1988). *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*.

Nishio, M., & Kusano, S. (1979). *Pyrenochaeta sp. as One of the Causal Agents of Upland Rice Soil Sickness*.

Pernek, M., Županić, M., Diminić, D., & Chech, T. (2011). *Vrste roda Phytophthora na bukvi i topolama u Hrvatskoj, Šumarski list*. *443*(001), 130–137.

Potočić, N., Seletković, I., Jakovljeveć, T., Marjanović, H., Indir, K., Medak, J., Ognjenović, M., & Zorić, N. (2019). *OŠTEĆENOST ŠUMSKIH EKOSUSTAVA*.

Spaić, I. (1974). *Šumarski list 7/9 1974*.

Udayanga, D., Castlebury, L. A., Rossman, A. Y., Chukeatirote, E., & Hyde, K. D. (2014). Insights into the genus Diaporthe: phylogenetic species delimitation in the D. eres species complex. *Fungal Diversity*, *67*(1), 203–229. https://doi.org/10.1007/s13225-014-0297-2

Vukelić, J. (2012). *Šumska vegetacija Hrvatske*. Sveučilište u Zagrebu.