

Izolacija micelija patogene gljive *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko & B. Sutton iz iglica crnog bora (*Pinus nigra* Arn.)

Paragi, Ana

Undergraduate thesis / Završni 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:108:693715>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-05**



Repository / Repozitorij:

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



FAKULTET ŠUMARSTVA I DRVNE TEHNOLOGIJE

ŠUMARSKI ODSJEK

PREDDIPLOMSKI STUDIJ ŠUMARSTVO

ANA PARAGI

**IZOLACIJA MICELIJA PATOGENE GLJIVE *Sphaeropsis sapinea* (FR.)
DYKO & B. SUTTON IZ IGLICA CRNOG BORA (*Pinus nigra* ARN.)**

ZAVRŠNI RAD

ZAGREB, rujan 2021.

PODACI O ZAVRŠNOM RADU

Zavod:	Zavod za zaštitu šuma i lovno gospodarenje
Predmet:	Šumarska fitopatologija
Mentor:	Prof.dr.sc. Danko Diminić
Komentorica:	Dr.sc. Jelena Kranjec Orlović
Studentica:	Ana Paragi
JMBAG:	0068233556
Akad. godina:	2020. / 2021.
Mjesto, datum obrane:	Zagreb, 24.9.2021.
Sadržaj rada:	Slika: 8 Tablica: 1 Navoda literature: 15

Sažetak:

Gljiva *Sphaeropsis sapinea* je patogen iglica, kore i drva različitih vrsta borova. Prilikom izolacije micelija sa crnog bora (*Pinus nigra*), korištene su dvije različite metode, metoda kotrljanja plodišta te metoda nanošenja suspenzije spora. Dobiveni miceliji značajno su se razlikovali u izgledu i broju micelija. Izgled dobivenih micelija promatran je na dvije hranjive podloge, Malt Extract Agar (MEA) i Potato Dextrose Agar (PDA). U istraživanju je dokazano da gljiva na obje hranjive podloge postiže zadovoljavajući rast i razlike u izgledu nisu uočene. Dobiveni miceliji gljive dugoročno su pohranjeni na dvije metode, prvom metodom u 15 % glicerol na -80 °C, a drugom metodom komadići micelija su pohranjeni u 50 % glicerol na 4 °C.

Summary:

Sphaeropsis sapinea fungus is a pathogen of different species of pine trees, their bark and needles. During the mycelium isolation from the black pine (*Pinus nigra*), two different methodes were used, method of rolling the fruiting body and spores solution applying method. The resulting mycelia have segnificantly differed in the shape and number of mycelium. The shape of resulting mycelia was opserved on two types of agar, Malt Extract Agar (MEA) and Potato Dextrose Agar (PDA). The result of experiment prove that the fungus reaches satisfactory growth on both agars and differences in shape or form have not been observed. Resulting fungus mycelia have long term been stored in two ways, first method was 15% glycerol at – 80 °C, and the second method, pieces of mycelia were stored in 50 % glycerol at 4 °C.

	IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI	OB FŠDT 05 07
		Revizija: 2
		Datum: 29.04.2021.

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

U Zagrebu, 24. rujna 2021. godine

vlastoručni potpis

Ana Paragi

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 Opće karakteristike gljive	2
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	4
3. MATERIJALI I METODE.....	6
3.1 Podrijetlo biljnih uzoraka.....	6
3.2 Izolacija gljive iz iglica – 8.4.2021.	6
3.3 Presadnja micelija u čiste kulture – 12.4.2021.....	6
3.4 Dugoročna pohrana micelija – 13.5.2021.....	7
4. REZULTATI	8
5. RASPRAVA	12
6. ZAKLJUČAK.....	14
7. LITERATURA	15

1. UVOD

Gljiva *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko et Sutton poznata je svijetu od 1823. kada je prvi puta opisana, a do danas ima mnoštvo sinonima kao što su *Sphaeria pinea* (Desm.) Kickx, *Sphaeria sapinea* Fr, a najučestaliji sinonim je *Diplodia sapinea* (Desm.) Kickx, ujedno i preferirani naziv EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) baze podataka. Spomenuti patogen je pripada odjelu *Ascomycota*, porodici *Botryosphaeriaceae*, a široko je rasprostranjen i nalazimo ga najčešće na borovima širom svijeta od Australije i Azije do Sjeverne i Južne Amerike te Europe. Osim na borovima često se pojavljuje na ostalim četinjačama, ali i na nekim rodovima kritosjemenjača, kao što su *Fagus*, *Prunus*, *Olea*, itd. Na kritosjemenjačama gljiva se ne ponaša patogeno i ne uzrokuje velika oštećenja iako ima i iznimaka (Zlatković i dr. 2017). S obzirom na patogenost gljivu *Sphaeropsis sapinea* mnogi znanstvenici smatraju parazitom slabosti. Drugim riječima, biljka mora biti izložena stresu kako bi gljiva prešla iz svoje latentne endofitske faze u parazitsku fazu (Swart i Wingfield 1991). Endofitske gljive žive endosimbiotski način života unutar stanica biljaka bez da izazivaju simptome, tj. biljka i gljiva mogu živjeti uzajamnim načinom života sve dok se u biljci ne poremeti ravnoteža, a što je najčešće uzrokovano nekim stresom. *S. sapinea* prelaskom na parazitski način života može smanjiti rast domaćina, produkciju hranjivih tvari i umanjiti sposobnost biljke da podnosi abiotičke stresove (suša i sl.) te smanjiti otpornost biljke na insekte, patogene i biljojede. Gljiva *S. sapinea* nekrotizira živi dio kore, a patogen dalje napreduje tako da toksinima usmrćuje žive stanice koje potom nastanjuje. Takav se tip patogena još naziva pertofit (Glavaš 1996, Diminić 1997). Gljivi *Sphaeropsis sapinea* u Europi se nije davala velika pozornost sve dok patogen nije uzrokovao ozbiljna odumiranja u Nizozemskoj 1982. i 1985. godine.

Genetskim analizama otkrivena su tri morfotipa patogena, A, B i C (Wet i dr. 2003). Za morfotip A je karakterističan pahuljasti micelij i konidije glatkih staničnih stijenki, dok je kod morfotipa B miceliji priljepljen uz površinu agara i stanične stijenke konidija su izbrazdane. Morfotip C poput morfotipa A ima pahuljasti miceliji i konidije glatkih staničnih stijenki no konidije morfotipa C su značajno duže nego kod od morfotipa A. Morfotip A ima veliku rasprostranjenost (Europa, Australija i Novi Zeland), a morfotip C je utvrđen na *Pinus ssp.* u Indoneziji. Izolati morfotipa C su znatno virulentniji od onih morfotipa A. Morfotip B je najmanje virulentan i zastupljen je u Sjevernoj Americi (Wet i dr. 2003).

U Hrvatskoj je ova patogena gljiva prvi put prijavljena 1957. godine u rasadniku u Bosiljevu (Böhm 1959, prema: Diminić 1997). Virulentniji morfotip A zastupljen je u Hrvatskoj. Gljiva je najučestalija na alepskom boru (*Pinus halepensis*), a najviše posljedica snosi crni bor (*Pinus nigra*). Također se pojavljuje na brucijskom boru (*Pinus brutia*), običnom boru (*Pinus sylvestris*) i planinskom boru (*Pinus mugo*) (Diminić 1994).

1.1 Opće karakteristike gljive

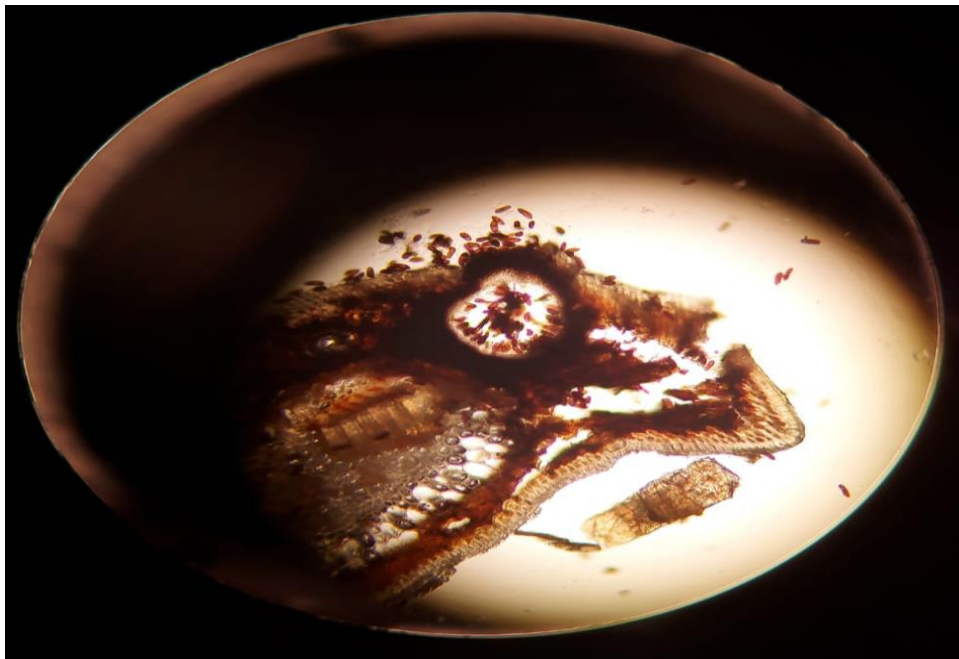
Tijekom svog životnog ciklusa gljiva *Sphaeropsis sapinea* stvara piknide (Slika 1). Piknide su vidljive na iglicama kao crna točkasta ispupčenja. Češeri se zaraze u drugoj godini razvoja te se na njima također nalazi velik broj piknida. Zbog toga se smatraju glavnim izvorom inokuluma. Osim toga piknide se razvijaju i u kori izbojaka, grana i debla. Kad su piknide zrele iz njih se oslobađaju nespodne spore - konidije, rasijavaju se te prenose na nove domaćine. Oslobađanje spora ovisi o klimatskim uvjetima. Uglavnom se oslobađaju za vrijeme vlažnog vremena. Zrele piknide u Hrvatskoj su utvrđene od travnja do listopada, što znači da je zaraza moguća tijekom cijelog vegetacijskog razdoblja.



Slika 1. Iglica sa piknidama gljive *Sphaeropsis sapinea*

Piknide su promjera 0,3 – 0,5 mm (Glavaš 1999). Na vrhu piknida nalazi se otvor kroz koji izlaze konidije, a one nastaju izravno na malim konidiogenim stanicama (Slika 2). Konidije su duguljaste i malo povijene, u mladosti neseptirane. Septa se razvije prije klijanja te podijeli sporu na dvije stanice.

Simptomi zaraze ovom gljivom se na biljkama lako uočavaju. Napredovanjem bolesti na krošnji su vidljive suhe iglice i osušeni izbojci. Zaražene iglice poprime smeđu boju te ugibaju. S druge strane patogen se može nalaziti i u zelenim iglicama. Intenzitet oboljenja krošnje ovisi o jačini zaraze. Kod jednogodišnjih sadnica prvi znak bolesti je sušenje vrhova. Patogen *Sphaeropsis sapinea* može uzrokovati i druga različita oboljenja kao što su: ukrivljivanje mladih izbojaka, sprječavanje razvoja najmlađih iglica i izbojaka, kloroza i nekroza starijih iglica, sušenje izbojaka i grana, sušenje dijelova krošnje, rak kore, plavilo drva kod živućih i srušenih stabala, propadanje korijena, oštećenje sjemena te polijeganje ponika. U rasadnicima može uzrokovati prstenastu trulež i trulež korijena biljaka (Diminić 1997).



Slika 2. Mikroskopski prikaz poprečnog presjeka piknide (sa konidijama) i iglice crnog bora

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Areal patogene gljive *S. sapinea* se proširuje, a tome pripomažu klimatske promjene (Stenlid i Oliva 2016). Promjena klime poboljšala je patogenu uvjete da se proširi i na sjever Europe. U Švedskoj je 2013.godine prvi puta zapažena zaraza šuma na sjeveru Europe. Tada se zaraza smatrala bezopasnom jer nisu uočena povezana oštećenja (Oliva i dr. 2013). Međutim, tri godine nakon prvog zapažanja, otkriveno je da je *S. sapinea* povezana s neviđenom zarazom na običnom boru (*Pinus sylvestris*). U kolovozu 2016. štete na razini sastojine utjecale su na plantažu od oko 15 ha sjeverno od Stockholma. Stotine stabala (starosti od 20 godina) običnog bora imala su jake simptome zaraze. Dobro razvijeno drveće potpuno je izgubilo sve izdanke tijekom te godine, a neka su i umrla. Zaraza je bila vrlo visoka, a većina pogođenih stabala u većini slučajeva su izgubila glavni izdanak (Brodde i dr. 2019). Sve učestalija *Sphaeropsis sapinea* postala je predmet mnogih istraživanja pa tako i u Hrvatskoj.

Najveća šteta od ove bolesti je u Hrvatskoj zapažena u Istri na crnom boru. U Istri su podizane kulture crnog i alepskog te drugih borova radi zaštitnih, ekonomskih te estetskih razloga (Zgrablić 2016). Umjetno podignute kulture za razliku od prirodnih su nestabilnije te izloženije štetnim biotskim i abiotskim čimbenicima. Štetnost patogena nije jednaka na svim lokalitetima. Vrlo je važna uloga staništa pri zarazi ovom gljivom. Stanišni čimbenici kao što su tip tla, matična podloga, inklinacija, stjenovitost i ekspozicija mogu utjecati na sami razvoj bolesti. Primjerice, u pojedinim slučajevima je depozicija sumporovog dioksida (SO₂) jedan od ključnih čimbenika za nastanak i razvoj bolesti. Također, jednim od vrlo važnih čimbenika pokazao se sadržaj kalija (K) i dušika (N), odnosno njihov međusobni odnos (N/K) u iglicama. Opće je poznato da kalij djeluje pozitivno na otpornost biljaka na patogene dok previše dušika omogućava bolje uvjete za njihov razvoj. Svi navedeni stresni čimbenici zabilježeni su u Istri i ostavili su posljedice na borove kulture, a ponajviše na crni bor (Diminić 1994, Diminić i dr. 2012).

Kao što je već prethodno spomenuto areal gljive *Sphaeropsis sapinea* proširuje se, te se patogen pojavljuje i na drugim domaćinima osim bora. Stoga je kontrola ovog patogena vrlo važna. Različitim metodama istraživanja pokušava se dodatno upoznati patogena, u čemu važnu ulogu mogu imati baze micelija izoliranih s različitih domaćina i područja. Dugotrajnom pohranom micelija se olakšava dostupnost micelija za nova učenja studenata te pojednostavljuje sam rad u laboratoriju za buduća istraživanja spomenute gljive. Usporedbom dostupnih izolata iz različitih dijelova Europe i lokaliteta unutar Hrvatske može se pratiti prilagodba gljive i različitost izolata. Cilj ovog rada je bio primijeniti i usporediti dvije različite metode izolacije

micelija gljive *Sphaeropsis sapinea* iz iglica crnog bora sa dva lokaliteta s područja Istre te dobivene micelije dugoročno pohraniti u bazi micelija Laboratorija za patologiju drveća na Sveučilištu u Zagrebu, Fakultetu šumarstva i drvne tehnologije. Metode koje su primijenjene u istraživanju su bile kotrljanje plodišta po hranjivoj podlozi te metoda nanošenja suspenzije spora na hranjive podloge. Karakteristike dobivenih micelija uspoređene su na dvjema različitim hranjivim podlogama.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Podrijetlo biljnih uzoraka

Uzorci zaraženih iglica crnog bora (*Pinus nigra*) za istraživanje uzeti su sa dva lokaliteta. Prvi uzorak (L1) uzet je 2012. godine sa područja Istre, a točan naziv lokaliteta / mjesta je nepoznat. Drugi uzorak za istraživanje uzet je isto iz Istre, mjesta Damijanići, u travnju 2020. godine. Oba navedena uzorka do početka istraživanja čuvana su na sobnoj temperaturi, pohranjeni u kartonskoj vrećici te skladišteni u Laboratoriju za patologiju drveća na Zavodu za zaštitu šuma i lovno gospodarenje.

3.2 Izolacija gljive iz iglica – 8.4.2021.

Stereomikroskopom su promatrane zaražene iglice crnog bora, tj. plodišta gljive *Sphaeropsis sapinea*. Tijekom promatranja, plodišta su izrezivana sterilnim skalpelom i pincetom te izdvojena na hranjive podloge u Petrijeve zdjelice dvjema različitim metodama. Svaka metoda je obuhvatila sedam velikih Petrijevih zdjelica sa MEA hranjivom podlogom (Malt Extract Agar) obogaćenom antibiotikom (streptomycin sulfat). Sav alat tijekom korištenja za obje metode, ali i za izrezivanje plodišta, prolazio je postupak sterilizacije (uranjanje u 96 % etanol i kratko izlaganje plamenu).

Prva metoda koja je korištena je metoda kotrljanja plodišta. Na poleđini svake Petrijeve zdjelice su ucrtane dvije paralelne linije. Jedno plodište je kotrljano po jednoj ucrtanoj liniji. Kao što i sam naziv govori, plodište se kotrlja od početka flomasterom obilježene linije te tako do samog kraja.

Metoda nanošenja suspenzije spora je druga metoda koja se primjenjivala. Prisutnost spora provjerila se mikroskopiranjem. Mikroskopski preparat su činili dio plodišta i kapljica sterilne destilirane vode. Kad je utvrđena prisutnost spora, odignuto je pokrovno stakalce te je okruglom vrstom igle, ezom, sakupljena voda sa preparata i razmazana u nekoliko vodoravnih crta po hranjivoj podlozi u Petrijevoj zdjelici.

Ovako pripremljene Petrijeve zdjelice su čuvane u komori rasta u kontroliranim uvjetima (Slika 3). Zadana temperatura komore je iznosila 24 °C, a zabilježena temperatura za vrijeme rada je bila 21,9 °C.

3.3 Presadnja micelija u čiste kulture – 12.4.2021.

Tijekom dva tjedna, dva puta tjedno provjeravan je rast micelija koji su po potrebi presađivani u nove Petrijeve zdjelice. Presađivanje je vršeno zbog dobivanja čistih kultura.

Presadivanje je obavljeno u mikrobiološkom kabinetu za rad u atmosferi čistoga zraka tj. laminaru. Za presađivanje korišten je sterilni alat i male Petrijeve zdjelice (promjera 55 mm) s PDA (Potato Dextrose Agar) i MEA (Malt Extract Agar) hranjivim podlogama.

3.4 Dugoročna pohrana micelija – 13.5.2021.

Komadići micelija uzimani su sterilnim alatom iz dobivenih čistih kultura. Korištene su dvije metode dugoročne pohrane. Prva metoda je pohrana komadića micelija u 15 % glicerol na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a druga metoda je pohrana komadića micelija u 50 % glicerol na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pravilnom dugoročnom pohranom, micelij može više godina ostati vitalan (npr. 5 godina).



Slika 3. Pohranjene Petrijeve zdjelice sa plodištima i sporama gljive *S. sapinea* u komori rasta

4. REZULTATI

Rezultati postupka izolacije gljive (8.4.2021.) prikazani su u Tablici 1. Od ukupno 14 Petrijevih zdjelica, miceliji gljive *S. sapinea* su bili prisutni u njih samo četiri. Najviše micelija dobiveno je metodom kotrljanja plodišta, sveukupno šest micelija dok su metodom nanošenja suspenzije spora dobivena samo dva micelija gljive. S lokaliteta L2 je dobiveno više micelija (5) u odnosu na lokalitet L1 (3). Kontaminacija je bila prisutna u svim uzorcima, u nekima više, a u nekima manje. Pojedine Petrijeve zdjelice nakon prve kontrole morale su biti uklonjene zbog prevelike kontaminacije. U njima su se uz micelije *Sphaeropsis sapinea* pojavile i plijesni roda *Penicillium*, ružičasti miceliji roda *Purpureocillium* te žutozeleni miceliji roda *Trichoderma* (Slika 4). Uzorci micelija za daljnju presađnju u čiste kulture uzimani su samo iz Petrijevih zdjelica koje nisu imale preveliku kontaminaciju. Od ukupno četiri Petrijeve zdjelice samo su iz tri presađivani miceliji *S. sapinea*. Nakon presađivanja na PDA (Potato dextrose agar) i MEA (Malt Extract Agar) hranjive podloge, miceliji gljive su se jednako razvijali.



Slika 4. Prisutnost micelija ostalih gljiva: *Penicillium* sp., *Purpureocillium* sp., *Trichoderma* sp.

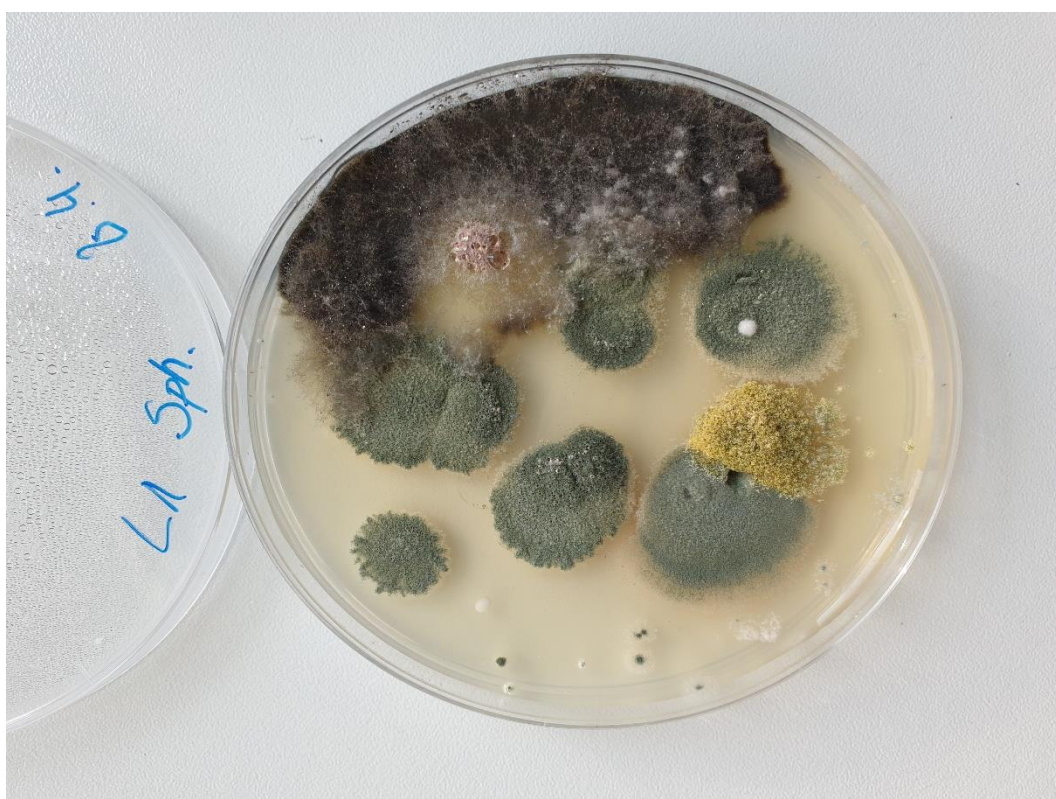
Tablica 1. Rezultati izolacije micelija iz iglica crnog bora izvršene 8.4.2021.

Broj pripremljenih velikih Petrijevih zdjelica (MEA)	Lokalitet L1-2012, Istra L2-2020, Damijanići, Istra	Metoda izolacije	Prisutnost micelija gljive <i>Sphaeropsis sapinea</i>	Kontaminacija uzorka
1	L2	Kotrljanje plodišta	3 micelija	Prisutna
2	L2	Kotrljanje plodišta	2 micelija	Prisutna
3	L1	Kotrljanje plodišta	1 miceliji	Prevelika kontaminacija
4	L1	Kotrljanje plodišta	-	Prevelika kontaminacija
5	L1	Kotrljanje plodišta	-	Prevelika kontaminacija
6	L1	Kotrljanje plodišta	-	Prevelika kontaminacija
7	L2	Kotrljanje plodišta	-	Prevelika kontaminacija
8	L1	Nanošenje suspenzije spora	2 micelija	Prisutna
9	L1	Nanošenje suspenzije spora	-	Prevelika kontaminacija
10	L1	Nanošenje suspenzije spora	-	Prevelika kontaminacija
11	L2	Nanošenje suspenzije spora	-	Prevelika kontaminacija
12	L1	Nanošenje suspenzije spora	-	Prevelika kontaminacija
13	L2	Nanošenje suspenzije spora	-	Prevelika kontaminacija
14	L1	Nanošenje suspenzije spora	-	Prevelika kontaminacija

Tjedan dana nakon izolacije su u Petrijevim zdjelicama bili vidljivi mali bijeli miceliji. Međutim, tek nakon 2 tjedna kada su miceliji poprimili tamnosivu boju sa sigurnošću se moglo utvrditi da se radi o micelijima gljive *Sphaeropsis sapinea*. Nije uočena ikakva razlika u brzini rasta i izgledu micelija s obzirom na korištenu metodu izolacije (Slika 5 i Slika 6). Daljnjom presadnjom u čiste kulture se micelij razvijao vrlo brzo, odnosno nakon samo nekoliko dana je ispunio Petrijevu zdjelicu promjera 55 mm. Mlađi micelij (starosti nekoliko dana) je bio bijele boje i čupave odnosno pahuljaste teksture (Slika 5). Stariji micelij (starosti nekoliko tjedana) je bio tamnosive do crne boje i on je u odnosu na mlađi miceliji bio više priljubljen uz hranjivu podlogu (Slika 6). Nije uočena razlika u morfološkim karakteristikama i rastu micelija između dvije korištene hranjive podloge, MEA i PDA.



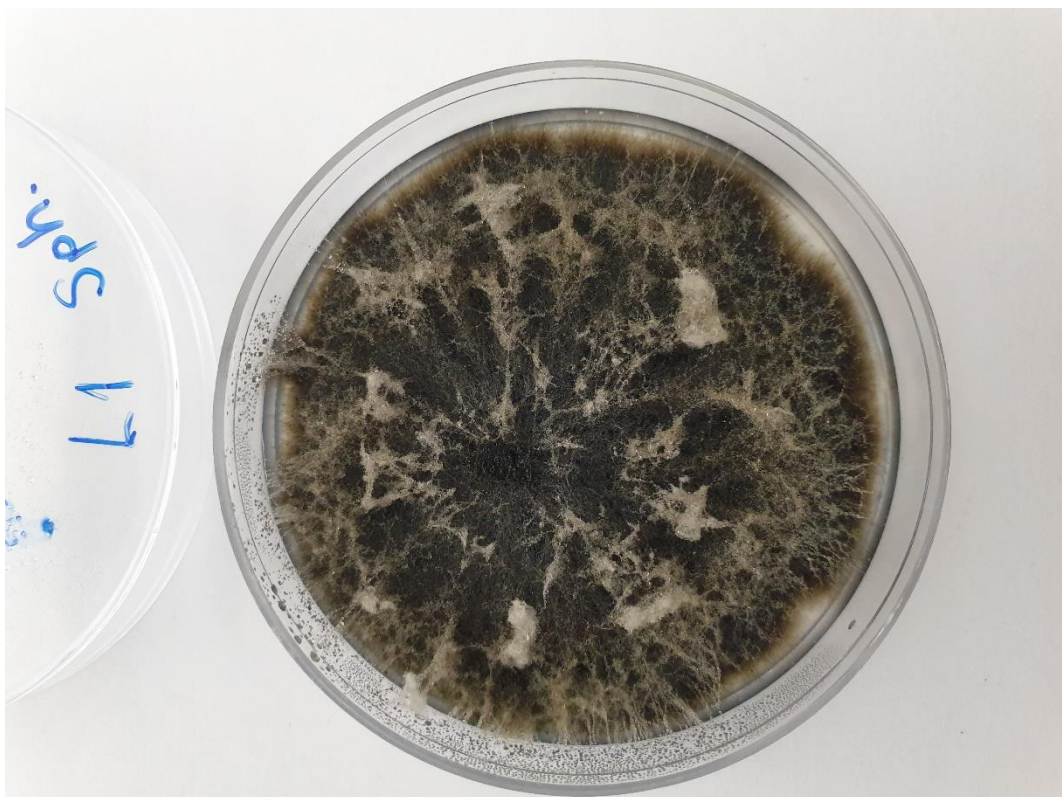
Slika 7. Miceliji gljive *Sphaeropsis sapinea* dobiveni metodom kotrljanja plodišta



Slika 8. Miceliji gljive *Sphaeropsis sapinea* dobiveni metodom nanošenja suspenzije spora



Slika 9. Čista kultura micelija gljive *Sphaeropsis sapinea* starosti nekoliko dana



Slika 10. Čista kultura micelija gljive *Sphaeropsis sapinea* starosti nekoliko tjedana

5. RASPRAVA

Prema dobivenim podacima može se uočiti razlika između dvije metode izolacije. Metoda kotrljanja kao što je prethodno objašnjeno temelji se na kotrljanju plodišta po ucrtanoj liniji na Petrijevoj zdjelici. Kotrlja se od početka linije do kraja kako bi se očistilo plodište tj. na početku ostaju nečistoće (bakterije) i ostale spore drugih gljiva, a konidije gljive *S. sapinea* postupno ispadaju te na kraju ostaje čisto plodište tj. spore samo tražene gljive (Slika 5), tako da je na kraju vodoravne linije za očekivati čisti miceliji gljive. Glavna razlika između metode kotrljanja plodišta i nanošenja suspenzije supstrata je mikroskopiranje. Kod nanošenja suspenzije, tek kad se mikroskopiranjem ustvrde spore u uzorku, ezom se prebacuju na hranjivu podlogu. Sličnost metoda je ta što se suspenzija nanosi u nekoliko vodoravnih crta što je slično ucrtanim linijama kod metode kotrljanja plodišta. S obzirom da se pri metodi kotrljanja koristilo čitavo plodište smatrano je da će kontaminacija hranjive podloge drugim gljivama biti veća, a pri drugoj metodi manja, a samim time i broj dobivenih micelija korištenjem druge metode veći. Rezultati pokazuju da je veći broj micelija nastao metodom kotrljanja plodišta (5), a znatno manji broj micelija (2) je nastao metodom nanošenja suspenzije na supstrat (Slika 6), što nije bilo u skladu sa očekivanjima. Navedeno je vjerojatno povezano sa različitom starošću korištenih uzoraka i činjenicom da je metoda nanošenja suspenzije uglavnom primijenjena na starijim uzorcima iglica (lokalitet L1, iglice iz 2012. g.). Generalno, sa lokaliteta L1 koji je bio zastupljen u devet Petrijevih zdjelica dobivena su tri micelija, a sa lokaliteta L2 koji je bio zastupljen u pet Petrijevih zdjelica pet micelija. Ovi rezultati upućuju da starost biljnog uzorka iz kojeg se vrši izolacija ima značajnu ulogu u uspješnosti postupka, odnosno kako spore u plodištima ipak s vremenom gube na svojoj klijavosti. Uzorci s lokaliteta L1 su sakupljeni 2012. godine i najveći dio spora gljive je do trenutka provedbe ovog istraživanja izgubio svoju klijavost. Međutim, neisključiv je utjecaj drugih čimbenika na rezultate broja dobivenih micelija. Uspoređujući broj pripremljenih Petrijevih zdjelica (14) sa brojem dobivenih micelija (8), vidi se da generalno uspješnost izolacije nije bila visoka. Mora se naglasiti da je tih osam micelija dobiveno unutar svega četiri Petrijeve zdjelice, dakle iz svega nekoliko plodišta.

Miceliji gljive *Sphaeropsis sapinea* dobiveni u istraživanju brzo su se razvijali. Starost micelija se mogla razlučiti po boji, mlađi pahuljasti miceliji su bili bijelo-sive (Slika 7), a stariji tamnosive do crne boje (Slika 8). Dobiveni miceliji su odgovarali karakterističnom opisu za morfotip A koji je naveden u literaturi. Morfotip B ima micelij pritisnut na površinu agara dok je morfotip C vrlo sličan morfotipu A, a razlika je u dužini konidija (de Wet i dr. 2003). Također, dobiveni miceliji jednako su se razvijali na obje hranjive podloge, PDA (Potato

dextrose agar) i MEA (Malt Extract Agar), i značajnih razlika u izgledu nije bilo, iako neka istraživanja ukazuju na to da miceliji gljive pri različitim temperaturama bolje rastu na PDA podlozi nego na MEA (Milijašević 2006). Dokazana optimalna temperatura za rast micelija je 25 °C, a po nekim istraživanjima 28 °C. Zabilježena temperatura komore rasta je u ovom istraživanju bila 21.9 °C, tako da je i to moglo utjecati na micelije. Iako temperatura utječe na razvoj micelija na hranjivoj podlozi (Milijašević 2006), u ovom radu nije detaljno obrađivana.

6. ZAKLJUČAK

Fitopatogena gljiva *Sphaeropsis sapinea* oportunistički je patogen koji najčešće napada borove (*Pinus* spp.) i ostale četinjače na obje Zemljine polutke, no sve prisutnija je i na kritosjemenjačama. Značajne štete izaziva u rasadnicima, monokulturama i jedan je od najčešćih patogena u urbanim sredinama. Jedna je od rijetkih patogenih gljiva koja napada gotovo sve biljne organe i na njima izaziva brojne simptome. U Hrvatskoj je najčešća zaraza na crnom boru, koji je uz bor munjiku (*P. heldreichii*) pokazao i najveću osjetljivost na ovu bolest. *Sphaeropsis sapinea* može doći i na drugim vrstama borova kod nas.

Na temelju rezultata rada i opažanja može se zaključiti da postoje razlike između dviju primijenjenih metoda izolacije no ne mogu se dati jasni zaključci o njihovoj efikasnosti. Kod metode kotrljanja plodišta na kraju vodoravne linije su čisti miceliji gljive dok kod metode nanošenja suspenzije to nije slučaj. S obzirom na različitu zastupljenost starijih i svježijih uzoraka zaraženih iglica u dvije korištene metode izolacije, ne može se točno odrediti koja metoda izolacije micelija je uspješnija. Kao što je već spomenuto rezultati upućuju da svježiji uzorak iglica iz 2020. godine ima veću uspješnost izolacije micelija, a on je nažalost u istraživanju korišten na manjem broju Petrijevih zdjelica. Iako su rezultati pokazali da starost zaraženih iglica utječe na uspješnost izolacije, odnosno klijavost spora, važno je istaknuti da su iz uzoraka iglica starih 9 godina (L1) ipak dobiveni neki izolati, te ovo istraživanje pokazuje i da takvi uzorci itekako mogu biti zarazni, što dokazuje da je gljiva *Sphaeropsis sapinea* otporan i jak patogen.

Na temperaturi od 21.9 °C nije bilo razlike u izgledu micelija između dvije hranjive podloge PDA (Potato dextrose agar) i MEA (Malt Extract Agar), zbog čega se može zaključiti kako gljiva na obje navedene podloge ostvaruje zadovoljavajući rast.

7. LITERATURA

1. Brodde, L., Adamson, K., Camarero J., Castaño, C., Drenkhan, R., Lehtijärvi, A., Luchi N., Migliorini, D., Sánchez-Miranda, A., Stenlid, J., Özdağ, Ş. and Oliva, J., 2019: Diplodia Tip Blight on Its Way to the North: Drivers of Disease Emergence in Northern Europe , URL; <https://www.frontiersin.org/>
2. Diminić, D., 1994: Prilog poznavanju mikoza borovih kultura u Istri. Glasnik za šumske pokuse, 30:21–60.
3. Diminić, D., 1997: Istraživanje gljive *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko et Sutton na borovima u Hrvatskoj. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, 170 str.
4. Diminić, D., Potočić, N., Seletković I., 2012: Uloga staništa u predispoziciji crnoga bora (*Pinus nigra* Arnold) na zarazu fitopatogenom gljivom *Sphaeropsissapinea* (Fr.) Dyko et Sutton u Istri. Šumarski list, 136(1-2):19-36
5. EPPO Global Database, URL: <https://gd.eppo.int/>
6. Glavaš, M., 1996: Osnove šumarske fitopatologije. Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, str. 1–140.
7. Glavaš, M., 1999: Gljivične bolesti šumskog drveća. . Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, str. 1–281.
8. Milijašević, T., 2006: Effect of temperature on the mycelial growth of the fungus *Sphaeropsis sapinea*
9. Oliva, J., Boberg, J., Stenlid, J., 2013: First report of *Sphaeropsis sapinea* on Scots pine (*Pinus sylvestris*) and Austrian pine (*P. nigra*) in Sweden, URL: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/>
10. Stenlid, J., Oliva, J., 2016: Phenotypic interactions between tree hosts and invasive forest pathogens in the light of globalization and climate change
11. Swart W. J., Wingfield, M. J., 1991: Biology and control of *Sphaeropsis sapinea* on *Pinus* species in South Africa. Plant Disease, 75:761–766.
12. URL: <https://hr2.wiki/wiki/Endophyte>
13. Wet, J., Burgess, T., Slippers, B., Preisi, O., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J., 2003: Multiple gene genealogies and microsatellite markers reflect relationships between morphotypes of *Sphaeropsis sapinea* and distinguish a new species of *Diplodia*
14. Zgrablić, Ž., 2016: Mikorizne gljive kao biološki pokazatelj zdravstvenog stanja kultura crnog bora (*Pinus nigra* J. F. Arnold) u Istri

15. Zlatkovic, M., Keca, N.D., Jami, F., Slippers , B., 2017: New and unexpected host associations for *Diplodia sapinea* in the Western Balkans, URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/>