

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA GOZDARSTVO IN  
OBNOVLJIVE GOZDNE VIRE

David GOLOBIČ

**GLIVE POVZROČITELJICE ODMIRANJA IN  
NEKROZ SKORJE ZELENEGA BORA V NASADIH  
IGLAVCEV MLAKE V BELI KRAJNII**

DIPLOMSKO DELO

Visokošolski strokovni študij – 1. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA GOZDARSTVO IN OBNOVLJIVE GOZDNE VIRE

David GOLOBIČ

**GLIVE POVZROČITELJICE ODMIRANJA IN  
NEKROZ SKORJE ZELENEGA BORA V NASADIH  
IGLAVCEV MLAKE V BELI KRAJINI**

DIPLOMSKO DELO  
Visokošolski strokovni študij – 1. stopnja

**FUNGI CAUSING DIEBACKS AND BARK  
NECROSES OF *PINUS STROBUS* IN CONIFER  
PLANTATIONS IN MLAKE BELA KRAJINA**

B. Sc. THESIS  
Professional Study Programmes

Ljubljana, 2015

Diplomsko delo je zaključek Visokošolskega strokovnega študija gozdarstva na Oddelku za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Določevanje povzročiteljev bolezni je potekalo v Laboratoriju za varstvo gozdov na Gozdarskem inštitutu.

Komisija za študijska in študentska vprašanja Oddelka za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire BF je dne 28. 08. 2015 sprejela temo in za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Dušana Jurca, za somentorico dr. Barbaro Piškur in recenzenta prof. dr. Roberta Brusa.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

David GOLOBIČ

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dv1
DK	GDK 443.3(043.2)=163.6
KG	zeleni bor/nekroze/glice
KK	
AV	GOLOBIČ, David
SA	JURC, Dušan (mentor)/PIŠKUR, Barbara (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 83
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire
LI	2015
IN	GLIVE POVZROČITELJICE ODMIRANJA IN NEKROZ SKORJE ZELENEGA BORA V NASADIH IGLAVCEV V BELI KRAJINI
TD	Diplomsko delo (Visokošolski strokovni študij – 1. stopnja)
OP	IX, 24 str., 4 pregl., 9 sl., 1 pril., 21 vir.
IJ	Sl
JI	sl/en
AI	V diplomski nalogi smo raziskovali zdravstveno stanje in bolezni zelenega bora ( <i>Pinus strobus</i> ) v nasadih iglavcev v Mlakah v Beli krajini. Namen naloge je bil določiti povzročitelje odmiranja borov in nekroz skorje na odmirajočih drevesih zelenega bora. V nasadih smo zato v letu 2015 večkrat nabrali vzorce obolelih rastlinskih delov, na Gozdarskem inštitutu Slovenije pa smo določevali povzročitelje bolezni. Vzorce smo shranili v zbirkо živih kultur Laboratorija za varstvo gozdov na Gozdarskem inštitutu Slovenije. Ugotovili smo, da se na zelenem boru, ki odmira predvsem zaradi močne okuženosti korenin z glivo <i>Phaeolus schweinitzii</i> , pojavljata tudi dve vrsti gliv iz rodu <i>Pezicula</i> in sicer vrsta <i>Pezicula eucrita</i> ter <i>Pezicula</i> sp. Ena ali obe vrsti sta verjetno vpleteni v nastanek nekroz skorje odmirajočih zelenih borov v Mlakah v Beli krajini.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dv1
DC	FDC 443.3(043.2)=163.6
CX	<i>pinus strobus</i> /necrosis/fungi
CC	
AU	GOLOBIČ, David
AA	JURC, Dušan (supervisor), PIŠKUR, Barbara (co-advisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 83
PB	University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of forestry and renewable forest resources
PY	2015
TI	FUNGI CAUSING DIEBACKS AND BARK NECROSES OF PINUS STROBUS IN CONIFER PLANTATIONS IN MLAKE BELA KRAJINA
DT	Graduation thesis (Professional Study Programmes)
NO	IX, 24 p., 4 tab., 9 fig., 1 ann., 21 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	<p>Health status and diseases found on <i>Pinus strobus</i> trees in conifer plantation Mlake in Bela Krajina were surveyed during this research. The purpose of the thesis was to determine fungi, causing necroses and drying of the bark on. <i>P. strobus</i> dying trees. In 2015 we collected samples of the diseased trees. Disease agents were determined in the Laboratory of Forest Protection at the Slovenian Forestry Institute. All fungal isolates, obtained during our research, were deposited in the Culture Collection of the Laboratory of Forest Protection at the Slovenian Forestry Institute. Based on our results and surveys, we conclude, that diebacks of <i>P. strobus</i> trees in Mlake are most likely a consequence of frequently present fungus <i>Phaeolus schweinitzii</i>. In addition, two fungal species from the genus <i>Pezicula</i> (<i>P. eucrita</i> and <i>Pezicula</i> sp.) were isolated from the diseased <i>P. strobus</i> trees. We believe that one or both species are also involved in the development of bark necroses of <i>P. strobus</i> in Mlake, Bela Krajina.</p>

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO PRILOG .....</b>	<b>IX</b>
<b>1        UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2        PREGLED OBJAV .....</b>	<b>2</b>
<b>3        PREDSTAVITEV OBJEKTA MLAKE.....</b>	<b>4</b>
3.1 GEOGRAFSKA LEGA.....	4
3.2 PODNEBNE ZNAČILNOSTI .....	4
3.3 RASTIŠČE .....	4
3.4 OPIS STANJA GOZDA.....	5
3.5 LESNA ZALOGA .....	5
<b>4        MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>6</b>
4.1 TERENSKO DELO.....	6
4.2 DELO V MIKROSKOPIRNICI.....	6
4.3 DELO V LABORATORIJU .....	7
4.4 MOLEKULARNA DETERMINACIJA PRIDOBLEJENIH IZOLATOV GLIV .....	9
4.4.1 Izolacija genomske DNA .....	9
4.4.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR) in univerzalnim glivnimi začetnimi oglikonukleotidi .....	9
4.4.3 Določevanje nukleotidnega zaporedja .....	11
4.4.4 Analiza pridobljenih sekvenc .....	11
<b>5        ZBIRKA ŽIVIH KULTUR LABRATORIJA ZA VARSTVO GOZDOV ..</b>	<b>12</b>
<b>6        REZULTATI Z RAZPRAVO .....</b>	<b>13</b>
6.1 GLIVA <i>PHAEOLUS SCHWEINITZII</i> .....	13
6.2 GLIVA <i>PEZICULA EUCRITA</i> IN <i>PEZICULA SP.</i> .....	15
<b>7        SKLEPI .....</b>	<b>21</b>
<b>8        ZAKLJUČEK .....</b>	<b>22</b>

**9           VIRI ..... 23**

**ZAHVALA**

**PRILOGE**

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Podatki o izolatih, ki so shranjeni v Zbirko živih kultur Laboratorija za varstvo gozdov na Gozdarskem inštitutu Slovenije (ZLVG) .....	12
Preglednica 2: Podatki o izolatih.....	15
Preglednica 3: Pet najbližjih zadetkov v bazi GenBank.....	16
Preglednica 4: Velikost mikrokonidijev vrste <i>Pezicula eucrita</i> .....	19

## KAZALO SLIK

Slika 1: Precepljene izolatov .....	8
Slika 2: Delo v sterilnem laminarju .....	8
Slika 3: Produkti verižne reakcije s polimerazo (PCR), ki smo jih ločili v 1-odstotnem agaroznem gelu skupaj z velikostnim standardom (žepek M) (100 bp GeneRuler, Fermentas). Vzorci: Mlake D1 (žepek 1), Mlake A1/4 (žepek 2), Mlake A1/2a (žepek 3), Mlake C1/4 (žepek 4), Mlake C1/3a (žepek 5), negativna kontrola postopka izolacije genomske DNA (žepek 6), negativna kontrola reakcije PCR (žepek 7). .....	11
Slika 4: Žoltorobi rjavopor ( <i>Phaeolus schweinitzii</i> ) iz nasada Mlake (15. 07. 2015) .....	13
Slika 5: Spodnji del trosnjaka glive <i>Phaeolus schweinitzii</i> (15. 07. 2015) .....	14
Slika 6: Filogenetsko drevo izbranih vrst gliv iz rodu <i>Pezicula</i> . Nukleotidna zaporedja, ki smo jih analizirali v sklopu te naloge, so označena s krogci. Zaporedja, ki smo jih pridobili iz že objavljenih raziskav, pa imajo dopisanega prvega avtorja in letnico raziskave. Zaporedja, ki smo jih dobili z iskanjem v bazi podatkov GenBank pa so brez dodatnih oznak.....	17
Slika 7: Nekroza skorje zelenega bora, ki jo povzroča gliva <i>Pezicula eucrita</i> .....	18
Slika 8: Mikrokonidiji glive <i>Pezicula eucrita</i> .....	19
Slika 9: Apoteciji glive <i>Pezicula eucrita</i> (Foto: Enrique Rubio Domínguez).....	19

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Nukleotidna zaporedja regije ITS rDNA, ki smo jih določili tekom naše raziskave ..... 26

## 1 UVOD

V gozdnem prostoru se velikokrat srečamo z različimi boleznimi gozdnega drevja. Tako lahko različne bolezni drevesa močno poškodujejo gozd, kar lahko vpliva na zmanjšanje prirastka, včasih pa povzroči tudi odmiranje drevesa. V naših razmerah imajo največji in najpomembnejši vpliv na bolezni gozdnega drevja glive.

Glive povzročajo različne bolezni, ki jih strokovno imenujemo mikoze. So heterotrofni organizmi, ki za svoje življenje potrebujejo organsko snov, ta pa je lahko rastlinskega ali živalskega izvora. Glive imajo izjemen vpliv pri kroženju snovi v naravi, saj razkrajajo organske snovi, ki so jih ustvarile avtotrofne rastline. Brez delovanja avtotrofnih in hetrotrofnih organizmov bi bilo življenje na Zemlji onemogočeno (Maček, 2008).

Nasadi iglavcev v raziskovalnem objektu Mlake v Beli krajini so bili osnovani v obdobju med letoma 1960 in 1965. Nasadi so bili osnovani na površini, kjer so v preteklosti prevladovali stelniki oziroma slab gozdovi hrasta s primesjo rdečega bora.

Na objektu se v različnih razvojih fazah dreves zelenega bora (*Pinus strobus*) pojavijo različni simptomi bolezni, ki so lahko posledica abiotskih ali pa biotskih dejavnikov. Zdravstveno stanje je bilo na tem območju pregledano samo enkrat in sicer leta 1983 (Hočevar, 1983), zato se nam je objekt zdel primeren za ugotavljanje bolezni v nasadih iglavcev.

Terensko delo je potekalo v objektu Mlake, kjer so nasadi iglavcev predvsem zelenega bora, smreke, duglazije in drugih drevesnih vrst. Pri nabiranju vzorcev smo se osredotočili na nekroze skorje in odmiranje zelenega bora (*Pinus strobus*). Okužene vzorce smo nabrali v ustrezni količini, pozorni pa smo bili predvsem na sušenje mladih dreves.

## 2 PREGLED OBJAV

Zeleni bor – *Pinus strobus* L.

Zeleni bor je iglasto drevo, ki spada v rod borov (*Pinus*). Zraste do 50 m visoko in do 3 m debelo drevo s precej nepravilno krošno. Naravno je razširjen predvsem v Severni Ameriki, kjer tvori obsežne naravne gozdove. V Evropo ga je leta 1705 prinesel Anglež Weymouth (Brus, 2004). Ob duglaziji in rdečem hrastu je zeleni bor najpogostejsa tujerodna drevesna vrsta v Sloveniji. Zeleni bor najprej razvije glavno korenino, kasneje pa tudi močnejše stranske korenine. Zaradi skromne in hitre rasti so ga pri nas uporabljali za pogozdovanje kislih in razvrednotenih tal (Gobarsko društvo Lisička Maribor, 2005). Raste lahko na različnih vrstah tal, najbolje pa na globokih in zmerno vlažnih ter nekoliko kislih tleh. Dobro prenaša nizko zimsko temperaturo, slabše pa sneg in veter.

Nekatere bolezni, ki se lahko pojavijo na zelenem boru (*Pinus strobus*), navajamo v nadaljevanju.

Žoltorobi rjavopor – *Phaeolus schweinitzii* (Fr.) Pat.

Poleg glive *Sparassis crispa* je gliva *Phaeolus schweinitzii* najpomembnejši vzrok trohnenja debel pri borih, duglaziji, smreki in macesnih v Veliki Britaniji. Najprej se pojavi na koreninah, vendar natančen potek okužbe še ni razjasnjen. Za širjenje verjetno potrebuje glivo iz rodu mraznic (*Armillaria*) (Butin, 1995).

Druge glive, ki povzročajo gnitje korenin bora:

- *Onnia tomentosa* (Fr.:Fr.) Karsten

Glivo lahko zelo hitro zamenjamo za glivo *Phaeolus schweinitzii*. Trosnjaki je debel in mesnat, rumenkasto cimetno rdeč, mehko kosmat velik od 6 do 12 cm ter običajno z ekscentričnim betom. Gliva lahko povzroča trohnobo lesa na dnu debla in koreninah dreves.

- *Calocera viscosa* (Pers.:Fr.) Fr.

Trosnjaki spominjajo na kozjo brado z nekaj manjšimi, razcepljenimi in razvejanimi vršički, 3 – 7 cm visoka, zlato rumena in lepljiva v vlažnem vremenu. Živi večinoma kot gniloživka na štorih macesna in parazitira tudi na boru, macesnu in drugih jelkah ter povzroča trohnobo lesa na dnu debla in koreninah dreves (Butin, 1995).

#### Mehurjevka zelenega bora ali ribezova rja - *Cronartium ribicola* J.C. Fisch. (1872)

Mehurjevka zelenega bora je zelo pomembna bolezen na zelenem ter drugih vrstah bora s petimi iglicami. Kot posledica okužbe nastanejo jeseni na iglicah slabo vidne rumene pegice, ki se naslednje leto povečajo v rumene trakove. Ko micelij prodre v skorjo, na njej opazimo spremembo barve, ki so lahko naravne olivno zelene do rumenkasto oranžne barve. V okuženi skorji lahko micelij živi več let, vsako pomlad pa na novo oblikuje veliko ecijev z eciostorami, pozimi micelij miruje. Gliva *Cronartium ribicola* je dvodomna heterokksena rja. Zeleni bor in nekateri drugi bori s petimi iglicami so haplontski gostitelji, ribez pa je dikariontski gostitelj. Na haplontskih gostiteljih tvori gliva spermogone ecije na dikariontskih pa uredinje in telije, ki oblikujejo bazidiospore. Za popolni razvoj mora imeti rja v bližini oba gostitelja. Okužba skorje zelenega bora se hitro širi, micelij v skorji raste v vse smeri, okuženi deli pa močno izločajo smolo. Mlada drevesa in sadike, katere so okužene z rjo, shirajo od dveh do štirih let, starejša drevesa pa lahko hirajo dvajset ali več let in potem se posušijo (Maček, 2008). Gliva ima v Evropi hiperparazita, to je gliva *Tuberculina maxima*, ki naseljuje ecije in preprečuje nastanek eciostor.

### **3 PREDSTAVITEV OBJEKTA MLAKE**

#### **3.1 GEOGRAFSKA LEGA**

Objekt Mlake leži v jugovzhodnem delu Slovenije v gozdnogospodarski enoti Metlika in spada v gozdnogospodarsko območje Novo mesto. Oddelek v celoti leži v katastrski občini Podzemelj. Meja oddelka poteka ob severu zahodu oddelka, kjer poteka tudi gozdna cesta Gradec-Mlake. Celotna površina objekta meri 120 ha.

#### **3.2 PODNEBNE ZNAČILNOSTI**

Nasadi iglavcev ležijo v nižinskem delu gozdnogospodarske enote, kjer se uveljavlja subpanonsko-kontinentalni podnebni režim. Povprečne letne temperature na tem območju se gibljejo okoli 10 °C, vegetacijska doba pa traja okoli 8 mesecev. Letna količina padavin doseže približno 1270 mm, od tega polovico padavin pade v vegetacijski dobi. Na tem območju je zaradi bližine reke Lahinje tudi višja prisotnost vlage (Gozdno gospodarski načrt, 2008).

#### **3.3 RASTIŠČE**

Površine na katerih rastejo nasadi iglavcev se pojavijo v blago razgibanem oziroma valovitem predelu na nadmorski višini od 140 m pa do 160 m. Na tem območju prevladujejo predvsem tla na karbonatu, ki so dokaj globoka in ilovnata. Na kakovost tal pa ima pomemben vpliv tudi človek, saj je bilo to območje pogosto osiromašeno s streljarjenjem.

Prevladujejo nasadi zelenega bora s primesjo smreke, duglazije in rdečega hrasta. V objektu lahko najdemo drevesa v vseh razvojnih fazah, vendar prevladujejo sestoji v obnovi kar je posledica vetroloma leta 2003. Podmladek je prisoten v vseh razvojnih fazah, najpogosteji pa je v sestojih v obnovi, kjer pokriva približno tretjino površine. V mladovju prevladujejo dobre in bogate zasnove, slabih zasnov je le slaba četrtina. Manj bogate zasnove so v drogovnjakih, kjer je zelo malo sestojev z bogato zasnovjo, vendar pa ni slabih zasnov (Gozdnogojitveni načrt, 2012).

### 3.4 OPIS STANJA GOZDA

Nižinski gozdovi hrasta in belega gabra predstavljajo 55 % gozdov gozdnogospodarske enote Metlika. Gozdovi spadajo v kategorijo večnamenskih gozdov s poudarjeno hidrološko funkcijo. To površino so prvotno poraščali gozdovi belega gabra in gradna, ki pa jih je človek s svojo nekontrolirano sečnjo in neustreznimi ukrepi zelo izčrpal. Ob pomanjkanju izboljševalnih ukrepov je nastala močna degradacija gozdov (steljnik, grmišča,...). Med letoma 1960 in 1965 so na zasebnih površinah, ki jih je država vzela v najem oziroma odkupila od lastnikov, začeli s pogozdovanjem zelenega bora, smreke in duglazije. Z opuščanjem ekstenzivnega gospodarjenja ter osnovnim urejanjem nege zasnovanih sestojev ter posvečanjem večje pozornosti pri pomlajevanju se je stanje zelo izboljšalo. Danes so na tej površini najkvalitetnejši gozdovi v enoti Metlika. V letu 2003 in delno 2004 je sestoje močno prizadel vetrogom, ki je naredil veliko škode, temu so dve leti zapored sledile še močne gradacije podlubnikov. V nasadih smreke in zelenega bora je ponekod v sestojih nastala vrzelasta struktura sestoja. Po vsej površini oddelka se naravno pomlajuje zlasti zeleni bor delno tudi beli gaber, zelo slabo pa se pomlajuje graden. V večjih degradiranih vrzelih se pojavlja močan zeliščni sloj praproti in robide (Gozdno gospodarski načrt, 2008).

### 3.5 LESNA ZALOGA

Lesna zaloga v sestojih znaša okoli 218 m<sup>3</sup>/ha. Kakovost drevja je dobra ponekod tudi prav dobra. Malo dreves je z odlično ali pa zelo slabo kakovostjo. Med pomembnejšimi vrstami rastiščno gojitvenega razreda ima najboljšo kakovost smreka. Zeleni bor, ki pa je zelo pogost, ima nekoliko slabšo kakovost, med tem ko imajo ostale drevesne vrste slabo kakovost (Gozdnogojitveni načrt, 2012).

## 4 MATERIALI IN METODE

### 4.1 TERENSKO DELO

Terensko delo je potekalo tekom poletja 2015. Nasade iglavcev smo večkrat prehodili ter bili pozorni na sušenje in nekroze skorje zelenega bora (*Pinus strobus*). Okužena manjša drevesa in skorjo z znachenji odmiranja na starejših drevesih smo poskušali nabratiti v čim večjem številu. Vse nabrane vzorce smo shranjevali v zato namenjene vrečke, na katere smo tudi napisali datum vzorčenja, drevesno vrsto, lokacijo nabiranja in na kratko opisali poškodbo na vzorčnem osebku. Določene okužbe in glive smo na terenu tudi fotografirali. Vzorci so bili isti dan pripeljani na Gozdarski inštitut Slovenije in nekateri vzorci so bili shranjeni v hladilniku pri temperaturi 4 °C.

### 4.2 DELO V MIKROSKOPIRNICI

Pregled vzorcev je potekalo v mikroskopirnici Laboratorija za varstvo gozdov na Gozdarskem inštitutu Slovenije. Za določevanje bolezni smo uporabljali mikroskop Olympus BX 53, ki je povezan s kamero Nikon, ta pa je povezana z računalnikom z računalniškim programom CellSens Dimension, s katerim smo opravili tudi večino meritve ter fotografij. Za makroskopski ogled poškodb pa nam je v pomoč prišla lupa proizvajalca Euromex DZ.5040.

Delo je potekalo tako, da smo najprej pregledali vse okužene vzorce, nato pa smo s pomočjo lupe določili mesto poškodbe in trosišča. Nato smo z uporabo laboratorijskih pripomočkov (skalpeli, pincete, igle) iz mesta poškodbe izrezali oziroma postrgali trose ter pripravili preparat. Na objektno stekelce smo s pipeto nanesli kapljico vode in v vodo prenesli trose, ki smo jih predhodno postrgali iz vzorca ter vse skupaj prekrili s krovnim stekelcem. Preparate smo nato pregledali pod mikroskopom ter s pomočjo kamere Nikon in računalniškega programa CallSens Dimension izvedli še meritve ter fotografije mikroskopskih preparatov.

Da smo dobili čim bolj natančne rezultate smo potrebovali vsaj 20 meritev (trosov, trosišč...), vendar je bilo to v določenih primerih težko dosegljivo, zato smo se zadovoljili tudi z manj meritvami. Rezultate meritev smo zaokrožili na 0.5 µm (Hawksworth, 1974).

Dobljene rezultate, ki smo jih dobili iz fotografij in meritev, smo nato primerjali z opisi gliv v fitopatoloških knjigah in različnimi determinacijskimi ključi za glice ter tako skušali ugotoviti vrste gliv.

Delo v mikroskopirnici kot je opisano v zgornjem postopku vsaj na pogled ne predstavlja večjih težav. Smo pa pri samem spoznavanju s tehniko in postopki naleteli na kar nekaj težav, saj delo pod lupo zahteva zelo mirno roko in pa veliko potrpljenja. Omeniti pa je potrebno, da je nekaj težav povzročala tudi determinacija posameznih gliv.

#### 4.3 DELO V LABORATORIJU

Na Gozdarskem inštitut Slovenije smo v Laboratoriju za varstvo gozdov izolirali iz nabranega materiala tudi pet izolatov gliv. Rastlinski material, ki smo ga nabrali dne 29. 05. 2015 smo do pričetka nadaljnjih postopkov shranili v hladilniku pri temperaturi 4 °C. En vzorec smo postavili v veliko stekleno petrijevko, v kateri je bila navlažena mokra podlaga za pospešitev razvoja trosišč oziroma trosov. Vseh pet izolatov gliv smo pridobili iz vzorcev zetih iz mladih dreves zelenega bora, ki so imeli znake nekroz in odmiranja skorje.

Dne 04. 06. 2015 smo začeli z izolacijami gliv iz nabranega rastlinskega materiala. Delo je potekalo po določenih korakih in sicer smo iz okuženih delov rastline, ki so se nahajali na skorji ali na prehodu iz skorje v zdrav les izrezali 2,5 mm × 2,5 mm velike koščke okužene skorje.

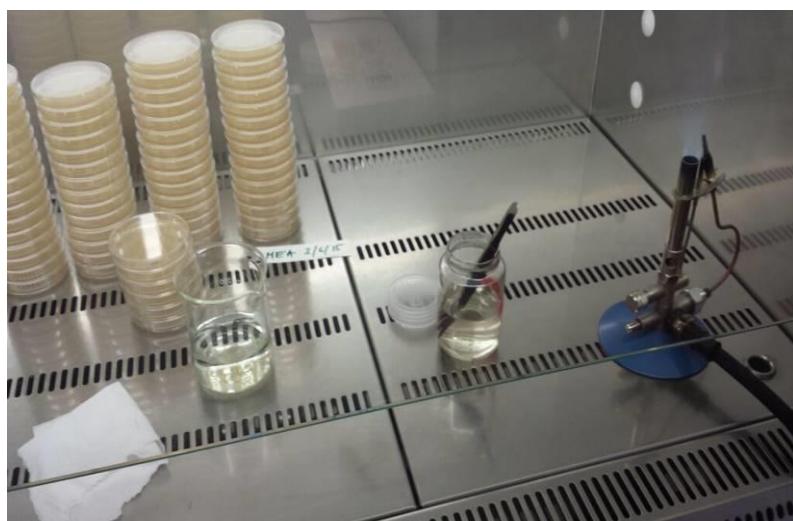
Za sterilizacijo omenjenih koščkov smo pripravili raztopino natrijevega hipoklorita s 3 % aktivnega klora. Vse koščke smo namočili v pripravljeno raztopino ter jih tako površinsko sterilizirali, nato pa smo jih popivnali na filter papirju ter jih prenesli na hranično gojišče (2 % sladni agar, (MEA); 20 g/l malt extract Bacto, 15 g/l agar Technical Difco). Tako

pripravljene petrijevke smo nato dali v inkubator, kjer so glive rasle v temi pri temperaturi 20 °C.

Precepljanje izolatov (slika 1) v novo čisto kulturo je potekalo dne 11. 06. 2015. Precepljanje kulture smo izvedli v laminarju, ki nam omogoča sterilno delo (slika 2). Iz prvotnega izolata smo vzeli vcepke micelija glive, in jih nato prenesli na nova gojišča MEA. Pri tem smo pazili, da smo pred vsakim prenosom vcepka skalpel sterilizirali z alkoholom in z ožiganjem.



Slika 1: Precepljene izolatov



Slika 2: Delo v sterilnem laminarju

## 4.4 MOLEKULARNA DETERMINACIJA PRIDOBLEJENIH IZOLATOV GLIV

### 4.4.1 Izolacija genomske DNA

Najprej smo iz čistih kultur izolirali genomsko DNA. Pred začetkom dela smo najprej izpolnili standardni obrazec ‐Obrazec LVG Ekstrakcija DNA‐, kamor smo zapisali vse potrebne podatke o izolatih gliv, katere smo vključili v molekularne analize. V molekularne analize smo vključili naslednje izolate:

Mlake D1 (04. 06. 2015), Mlake A1/4 (11. 06. 2015), Mlake A1/2a (29. 06. 2015), Mlake C1/4 (11. 05. 2015), Mlake C1/3a (29. 06. 2015).

S sterilnim skalpelom smo postrgali približno 1 cm<sup>2</sup> micelija čiste kulture glive s površine trdnega gojišča in ga prenesli v sterilizirane 1,5-ml epice (Eppendorf). Skalpel smo sterilizirali z ožiganjem pred vsakim strganjem micelija.

Izolacijo genomske DNA smo izvedli z uporabo komercialnega kita za ekstrakcijo genomske DNA NucleoSpin Plant II kit (Macherey-Nagel) po protokolu proizvajalca (Genomic DNA from plant, 2013) z manjšimi spremembami. Pridobljeno genomsko DNA smo shranili v 1,5-ml epice, ki smo jih ustrezno označili in do nadaljnjih analiz shranili pri temperaturi 4 °C.

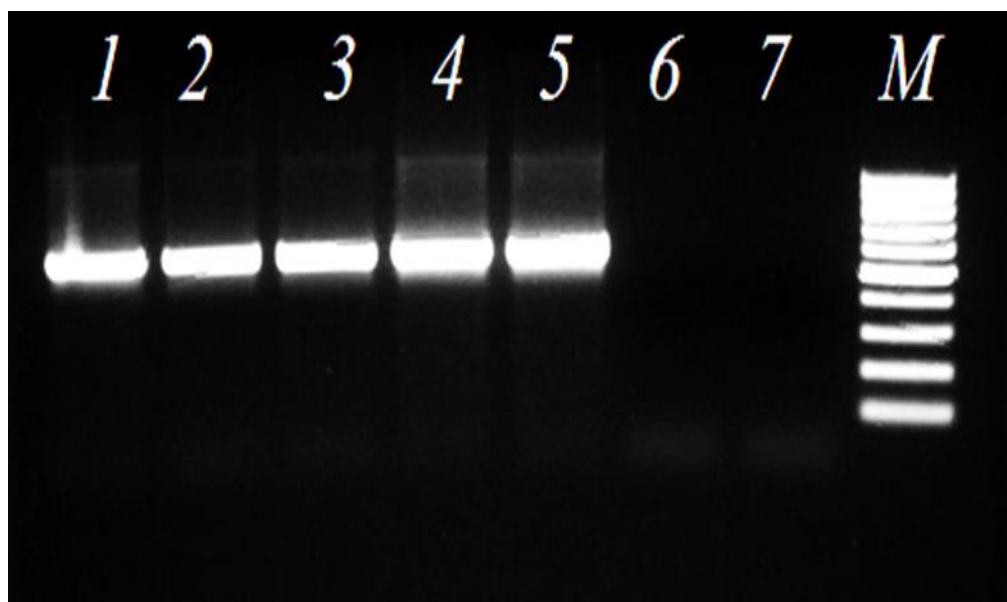
### 4.4.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR) in univerzalnim glivnimi začetnimi oglikonukleotidi

Pred začetkom dela smo izpolnili standardni obrazec ‐Obrazec LVG PCR‐, kamor smo zapisali podatke o uporabljenih kemikalijah, reakcijskih pogojih in o vzorcih genomske DNA, ki smo jih vključili v analizo.

Za negativno kontrolo reakcije PCR smo uporabili vodo, ki ne vsebuje nukleaz (Fermentas).

Z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) smo pomnoževali odsek DNA v genomu gliv, ki zajema regijo 18S rRNA (delno), ITS1, 5,8S rDNA, ITS2 in 28S rRNA (delno). Za pomnoževanje smo uporabili glivna univerzalna začetna oligonukleotida ITS1 in ITS4 (White in sod., 1990). 50-mikrolitrska reakcijska mešanica za izvedbo PCR je vsebovala 15 µl pufra AmpliTaq Gold 360 MM (Invitrogen), 0,6 µl GC Enhancer-ja (Invitrogen), 1,8 µl vsakega od 10µM začetnih oligonukleotidov (Sigma Aldrich), 2,5 µl ekstrahirane DNA s približno koncentracijo 100 µg/ml in 8,3 µl vode, ki ne vsebuje nukleaz (Fermentas). Za pomnoževanje smo uporabili naslednji program: začetni 3-minutni denaturaciji pri temperaturi 95 °C je sledilo 39 ciklov denaturacije pri 95 °C (30 s), prileganja pri 55 °C (45 s) in podaljševanja pri 72 °C (90 s), postopek pa se je končal z 10-minutnim podaljševanjem pri 72 °C. Reakcijo PCR smo izvedli v aparaturi PCR Mastercycler (Eppendorf).

Za preverjanje uspešnosti reakcije PCR smo uporabili horizontalno agarozno gelsko elektroforezo. Gel smo pripravili iz 1-odstotne (w/v) raztopine agaroze (Sigma Aldrich) v pufru 1 × Tris-acetat EDTA (TAE) z dodatkom etidijevega bromida do končne koncentracije  $5 \times 10^{-4}$  µg/ml. V žepke gela smo nanesli 10 µl posameznega produkta reakcije PCR skupaj s 2 µl nanašalnega pufra 6 × Loading Dye. Na gel smo nanesli tudi molekularni marker, ki je sestavljen iz standardiziranih dolžin nukleotidnih fragmentov. Elektroforeza je potekala v pufru 1 × TAE pri konstantni napetosti 110 V. Po končani elektroforezi smo DNA vizualizirali na UV-transiluminacijskem sistemu za zajem slike (MiniBis Pro, DNR BioImaging Systems). Velikost posameznega produkta PCR (slika 3) smo ocenili na osnovi primerjave z molekularnim markerjem.



Slika 3: Produkti verižne reakcije s polimerazo (PCR), ki smo jih ločili v 1-odstotnem agaroznem gelu skupaj z velikostnim standardom (žepek M) (100 bp GeneRuler, Fermentas). Vzorci: Mlake D1 (žepek 1), Mlake A1/4 (žepek 2), Mlake A1/2a (žepek 3), Mlake C1/4 (žepek 4), Mlake C1/3a (žepek 5), negativna kontrola postopka izolacije genomske DNA (žepek 6), negativna kontrola reakcije PCR (žepek 7).

#### 4.4.3 Določevanje nukleotidnega zaporedja

Za namen sekvenciranja smo pomnoženo regijo DNA očistili s kompletom za čiščenje produktov PCR Wizard SV gel in PCR Clean-Up sistem (Promega) po navodilih proizvajalca (Technical Bulletin, 2009).

Sekvenciranje obeh verig DNA je bilo izvedeno v podjetju Macrogen na Nizozemskem z enakima začetnima oligonukleotidoma, ki sta bila uporabljena tudi v reakcijah PCR. Sekvence smo ročno analizirali s programom SeqTrace (Stucky, 2012). Vse nejasne nukleotidne pozicije so bile razjasnjene s primerjavo sekvenc obeh verig pomnožene regije DNA.

#### 4.4.4 Analiza pridobljenih sekvenč

Tako pridobljene sekvenče smo poravnali s programom MAFFT (dostop preko <http://align.genome.jp/mafft>). Urejene sekvenče smo primerjali z bazo podatkov (nr/nt) za

BLAST s programom BLASTN (dostop preko [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Pridobljene sekvence smo shranili v javno bazo podatkov GenBank.

## 5 ZBIRKA ŽIVIH KULTUR LABRATORIJA ZA VARSTVO GOZDOV

Po končani molekularni determinaciji smo precepljene izolate shranili v zbirkо živih kultur Laboratorija za varstvo gozdov na Gozdarskem inštitutu Slovenije (ZLVG) (Piškur, 2014).

Vsak izolat smo opremili z evidenčnim listom, kateri je vseboval podatke o oznaki izolacije, lokaciji ter datumu nabiranja, o podlagi iz katerega je bil izoliran vzorec, gostitelju ter nabiralcu in osebi, ki je določila vzorec. Izolate smo s pomočjo računalniškega programa *Boletus informaticus* vnesli v zbirkо podatkov. Vsak shranjen izolat je dobil svojo identifikacijsko številko, ki je sestavljena iz oznake zbirke in pripadajoče številke.

Preglednica 1: Podatki o izolatih, ki so shranjeni v Zbirkо živih kultur Laboratorija za varstvo gozdov na Gozdarskem inštitutu Slovenije (ZLVG)

Šifra izolata	Datum izolacije	Država izvora	Ident. št. ZLVG
Mlake D1	04. 06. 2015	SLO	ZLVG468
Mlake A1/4	11. 06. 2015	SLO	ZLVG469
Mlake A1/2a	29. 06. 2015	SLO	ZLVG470
Mlake C1/4	11. 05. 2015	SLO	ZLVG471
Mlake C1/3a	29. 06. 2015	SLO	ZLVG472

## 6 REZULTATI Z RAZPRAVO

### 6.1 GLIVA *PHAEOLUS SCHWEINITZII*

V nasadih iglavcev Mlake v Beli krajini smo ugotovili, da odmirajoča drevesa zelenega bora odmirajo najverjetneje zaradi močno prisotne glive *Phaeolus schweinitzii*. Trosnjake glive smo opazili na več različnih mestih, kar nakazuje, da je gliva zelo razširjena na objektu. Gliva se je velikokrat pojavila v okolici odmirajočih debel starih dreves zelenega bora, videvali smo jo še na koreninah izruvanih dreves. Zelo pogosto pa smo jo opazili tudi v bližini mladih dreves zelenega bora, ki so bili oslabljeni ali posušeni.

Slovensko ime: Žoltorobi rjavopor - VZNOŽNA TROHNOBA IGLAVCEV

Latinsko ime: *Phaeolus schweinitzii* (Fr.) Pat.

Sinonim: *Polyporus schweinitzii* Fr.,

Taksonomska uvrstitev: *Fomitopsidaceae*, *Polyporales*, *Agaricomycetes*, *Basidiomycota*,  
*Fungi*

Gliva (slika 4) povzroča rjavo prizmatično trohnobo jedrovine v koreninah ter v spodnjem delu drevesa do višine 2,5 metra. Po trosnjakih lahko spoznamo trohnobo. Gliva se pojavi predvsem na borih, smreki, macesnu in duglaziji. Gliva se redko pojavi pri sadkah in mlajših drevesih bolj pogosto pa obolijo drevesa, ki so starejša od 50 let. Ta so tudi bolj občutljiva na ekstremne vremenske pojave (Maček, 2008).



Slika 4: Žoltorobi rjavopor (*Phaeolus schweinitzii*) iz nasada Mlake (15. 07. 2015)

Barva okuženega lesa je rumenkasta do bledordečkasto rjava kasneje pa postane temnejša. Les v katerem je prisotna gliva je trohneč in krhek. Pojavljajo se razpoke, zaradi česa les razpade na koščke. V razpokah se pojavi bela plast micelija. Strohnel les ima vonj po terpenitnu in je drobljiv. Trosnjaki glive rastejo na spodnjem delu debla, pri tleh na starih ranah dreves. Njihova velikost je do 30 cm. Po sestavi so bolj mehke in mesnate. Po obliki so bolj okrogle v obliki krožnika ali lijaka. Običajno jih raste več skupaj. Pojavljajo se tudi na debelejših koreninah ne le na vratu korenine okuženega drevesa (Maček, 2008).

Zgornja plast trosnjaka je žametasto rdečkastorjave barve s koncentričnimi conami in svetlorumeno rjavim robom, na spodnji strani pa se nahaja izrazito rumenkasto zelena poroidna trosovница, ki ob dotiku spremeni barvo v rjavo (slika 5). Ta površina ima najprej pore ovalnih oblik, nato pa postanejo oglate. Trosi se oblikujejo od maja do oktobra, vendar lahko najdemo odmrle trosnjake tudi izven tega obdobja (Butin, 1995).



Slika 5: Spodnji del trosnjaka glive *Phaeolus schweinitzii* (15. 07. 2015)

Pri glivi je značilno, da trosnjaki vsako leto zrastejo iz bolj ali manj v sredini nameščenega beta. Trosnjaki ki so že zelo stari spremenijo barvo in so na koncu umazane rjave do črne

barve, potem pa propadejo. Trosovnico tvorijo labirintne luknjice oziroma pore, ki so v mladosti zeleno-rumene barve s starostjo pa postajo rjave. Klobuk je velik od 8 cm – 30 cm in debel okoli 1 cm – 4 cm. Posamezni klobuki lahko obrastejo veje, listje in travo. Zunanja površina je valovita oziroma nagubana in močno polstena ali dlakava. Gliva tvori nepravilno valjast do gomoljast trd bet višine od 3 – 8 cm in širine od 2 cm – 5 cm. Trosi so veliki od 5 µm – 8,5 µm × 3,5 – 4,5 µm, elipsasti in gladki, trosni prah pa je bel (Gobarsko društvo Lisička Maribor, 2005).

## 6.2 GLIVA PEZICULA EUCRITA IN PEZICULA SP.

Iz nabranih vzorcev nekroz skorje zelenega bora (*Pinus strobus*) smo izolirali pet čistih kultur iz različnih delov skorje. Pri tem smo vse vzorce označili z oznakami, ki so prikazani v spodnji preglednici.

Preglednica 2: Podatki o izolatih

ŠT. VZORCA	MESTO POŠKODBE	OZNAKA IZOLATA	DATUM IZOLACIJE
1	Trosišče na skorji	Mlake, A1/4	11. 06. 2015
2	Trosišče na skorji	Mlake, A1/2a	29. 06. 2015
3	Nekroze na deblu	Mlake, C1/4	29. 06. 2015
4	Nekroze na deblu	Mlake, C1/3a	11. 06. 2015
5	Trosišča na deblu	Mlake, D1	04. 06. 2015

Na osnovi izvedene molekularne analize in filogenetske primerjave naših zaporedij (Mlake) smo ugotovili, da sta izolata Mlake A1/4 in Mlake A1/2a vrsta *Pezicula eucrita*. Izolatov Mlake D1, Mlake C1/4 in Mlake C1/3a pa na osnovi izvedenih analiz ne moremo določiti do nivoja vrste. Najverjetnejše predstavlja eno izmed vrst, ki se uvršča v rod *Pezicula*.

V spodnji preglednici smo prikazali posamezne rezultate o izolatih, kateri so bili analizirani z molekularno analizo, pri tem ima vsak izolat pet najbližjih zadetkov po iskanju ujemajočih zaporedij v bazi nukleotidnih zaporedij GenBank.

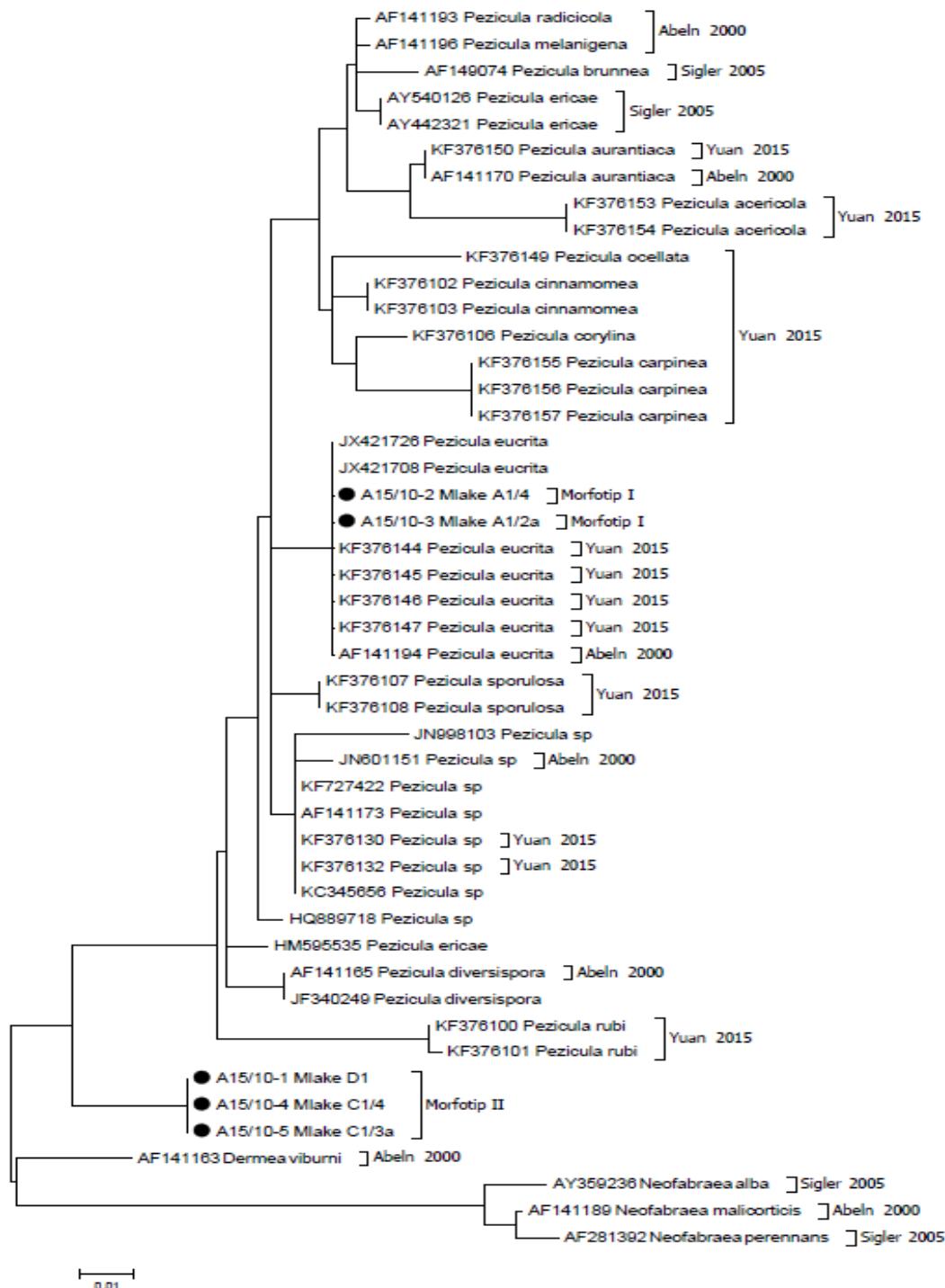
Preglednica 3: Pet najbližjih zadetkov v bazi GenBank

Izolat	Številka GenBank	Najbližji zadetki <sup>a</sup>		QC (%) <sup>b</sup>	Identičnost (%)
		Taksonomsko ime v GenBank	Številka GenBank		
<b>Mlake D1</b>	KT380831	<i>Cryptosporiopsis ericae</i>	HM595535	93 %	95 %
		<i>Pezicula</i> sp.	JN998103	92 %	95 %
		<i>Pezicula</i> sp.	JN601151	93 %	95 %
		<i>Cryptosporiopsis</i>	AF141165	95 %	95 %
		<i>Pezicula</i> sp.	AF141173	100 %	95 %
<b>Mlake A1/4</b>	KT380832	<i>Pezicula eucrita</i>	AF141194	96 %	100 %
		<i>Pezicula eucrita</i>	KF376144	91 %	100 %
		<i>Pezicula eucrita</i>	JX421708	91 %	100 %
		<i>Pezicula eucrita</i>	JX421726	94 %	99 %
		<i>Pezicula</i> sp.	JF440606	94 %	99 %
<b>Mlake A1/2a</b>	KT380833	<i>Pezicula eucrita</i>	AF141194	100 %	100 %
		<i>Pezicula eucrita</i>	KF376144	99 %	100 %
		<i>Pezicula eucrita</i>	JX421726	99 %	100 %
		<i>Pezicula eucrita</i>	JX421708	99 %	100 %
		<i>Pezicula</i> sp.	JF440606	100 %	99 %
<b>Mlake C1/4</b>	KT380834	<i>Cryptosporiopsis diversispora</i>	AF141165	100 %	95 %
		<i>Pezicula eucrita</i>	KF376144	95 %	94 %
		<i>Pezicula</i> sp.	KF376112	95 %	94 %
		<i>Pezicula sporulosa</i>	KF376107	95 %	94 %
		<i>Pezicula eucrita</i>	JX421708	95 %	94 %
<b>Mlake C1/3a</b>	KT380835	<i>Cryptosporiopsis diversispora</i>	JF340249	96 %	95 %
		<i>Cryptosporiopsis diversispora</i>	AF141165	98 %	95 %
		<i>Pezicula</i> sp.	HQ889718	98 %	94 %
		<i>Pezicula</i> sp.	KC345656	98 %	94 %
		<i>Pezicula</i> sp.	KF727422	98 %	94 %

<sup>a</sup> pet najbližjih zadetkov po iskanju ujemajočih zaporedij s funkcijo BLAST v bazi nukleotidnih zaporedij GenBank (izvedba 10. avgusta 2015)

<sup>b</sup> prekrivanje nukleotidnega zaporedja (query coverage)

Izdelali smo tudi filogenetsko drevo (slika 6) izbranih vrst gliv iz rodu *Pezicula*, narejeno po analizi nukleotidnih zaporedij ITS rDNA z metodo največjega verjetja s programskim paketom MEGA5.



Slika 6: Filogenetsko drevo izbranih vrst gliv iz rodu *Pezicula*. Nukleotidna zaporedja, ki smo jih analizirali v sklopu te naloge, so označena s krogci. Zaporedja, ki smo jih pridobili iz že objavljenih raziskav, pa imajo dopisanega prvega avtorja in letnico raziskave. Zaporedja, ki smo jih dobili z iskanjem v bazi podatkov GenBank pa so brez dodatnih oznak.

*Pezicula eucrita* (P. Karst) P. Karst

Anamorf: *Cryptosporiopsis abietina* Petr.

Taksonomska uvrstitev: *Fungi, Ascomycota, Leotiomycetes, Helotiales, Dermateaceae,*

*Pezicula*



Slika 7: Nekroza skorje zelenega bora, ki jo povzroča gliva *Pezicula eucrita*

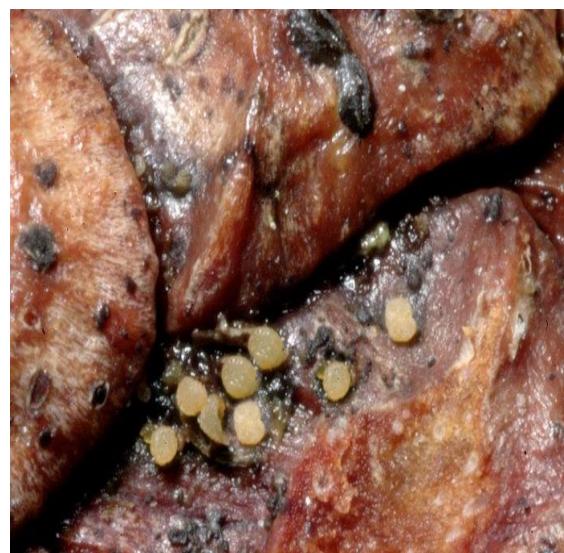
Glivo *Pezicula eucrita* smo odkrili na mlajših drevesih zelenega bora (*Pinus strobus*). Gliva je na skorji mladih dreves najprej povzročila nekrozo (slika 7), ki je rdečkastorjave do rumenorjave barve, kasneje pa so se na nekrozi razvila tudi trosišča. Ker je gliva oblikovala samo mikrokonidije je z morfološko identifikacijo nismo uspeli določiti do vrste, zato smo glivo večkrat izolirali v čisti kulturi ter jo nato z molekularnimi analizami tudi določili. Pod mikroskopom smo izvedli tudi slike in meritve mikrokonidijev (slika 8), ki so prikazane v spodnji tabeli.

Preglednica 4: Velikost mikrokonidijev vrste *Pezicula eucrita*

	Dolžina	Širina
Povprečje	4,5 µm	1,5 µm
Makimalna	5,5 µm	2,5 µm
Minimalna	4,0 µm	1,5 µm



Slika 8: Mikrokonidiji glive *Pezicula eucrita*



Slika 9: Apoteciji glive *Pezicula eucrita* (Foto: Enrique Rubio Domínguez)

Spolna trosiča glive (teleomorf) *Pezicula eucrita* so apoteciji, ki rastejo posamično ali do največ pet skupaj na bazalni stromi. Lahko so sedeči ali pa s kratkim pecljem. Disk apotecija je krožen, najprej raven nato pa konveksen. Ko je svež je bledo rumenkasto zelen ali cimetast z rdeče rjavo ali rumenorjavo bledo prevleko. Ko se posuši je lahko tudi cimetaste barve z bledo prevleko. Bazalna stroma je vraščena v substrat in je temno rjave barve. Sestavljeni so iz pravokotnih oranžno-rjavih celic, ki so lahko zadebeljene do največ 1,5 µm. Celice so znotraj kratkega peclja prizmatične ali hifaste ter potekajo vzporedno s površjem, zunanje celice pa so izodiametrične. Askospore so neenakostraničnih oblik, lahko so v obliki podaljšanih elipsoidov ali pa so široko srpaste, ravne ali ukrivljene, včasih so oblikovane tudi v oblike črke S. Askospore lahko proizvedejo makrokonidije direktno iz majhnih odprtinic v stenah spor. Askospore, ki so ujeti znotraj nefunkcionalnih askov lahko tvorijo hife (Verkley, G.J.M. 1999). Apotecijev glive *Pezicula eucrita* nismo našli na vzorcih iz nasada Mlake.

Terminalne mikrokonidiogene celice so cilindrične ali ozke, velike  $5 - 10 \times 2 - 3 \mu\text{m}$ . Mikrokonidiji so cilindrični in ravni ter zaokroženi v konici ali malenkost zoženi v odsekani osnovi, velikosti so  $3,5 - 5 \times 1 - 1,5 \mu\text{m}$ . Makrokonidijske celice so ločene ali integrirane na enostavnih poredkoma razvejanih, septiranih konidjosporah velikosti  $(25 - 35 - 50 \times 3 - 5 \mu\text{m})$ . Makrokonidiji so lahko podaljšani elipsoidi ali podolgovati lahko so tudi ravni ali rahlo upognjeni (Verkley, G.J.M. 1999).

Gliva *Pezicula eucrita* je bila pri nas ugotovljena kot anamorf *Cryptosporiopsis abietina* Petr. v odmirajočih vejicah črnega bora (*Pinus nigra* Arn.) na Krasu (Jurc, 2003). Glivo so izolirali iz skorje 1,7 % odmrlih vej črnega bora, iz živih vej je niso izolirali.

## 7 SKLEPI

Z laboratorijsko in molekularno analizo smo na odmrlih in odmirajočih zelenih borih določili prisotnost gliv *Phaeolus schweinitzii* in *Pezicula eucrita* ter *Pezicula* sp. Če primerjamo ugotovljene bolezni s popisom bolezni, ki jih je leta 1983 v nasadih iglavcev naredila Stana Hočevar ugotovimo, da navedene glive v popisu niso bile ugotovljene, najverjetnejše pa niso bile prisotne v nasadu. Za zdravstveno stanje sestojev zelenega bora v nasadu Mlake je odkritje močne okužbe sestojev z glivo *Phaeolus schweinitzii* še posebej pomembno, saj bo bolezen vznožna trohnoba iglavcev v prihodnosti najverjetnejše povzročala vedno večje poškodbe koreninskega sistema in trohnobo spodnjega dela debel zelenega bora in drugih občutljivih iglavcev, sušenje mladja in odraslih dreves in tudi večjo občutljivost okuženih dreves na snegolom in vetrogom. Gliva *Pezicula eucrita* je slabo patogena, naseli se lahko v skorjo odmirajočih dreves zelenega bora in na vitalnih drevesih verjetno ne more povzročiti nekroz skorje.

## 8 ZAKLJUČEK

V diplomski nalogi smo raziskovali zdravstveno stanje zelenega bora v nasadih iglavcev v Mlakah v Beli krajini. Ta objekt se nam je zdel idealna lokacija za raziskovanje saj so ta rastišča sprva poraščali steljniki. V 60. letih prejšnjega stoletja pa so bile te površine spremenjene v nasade iglavcev predvsem zelenega bora, smreke, duglazije in macesna. Številna drevesa kažejo znamenja bolezni in hiranja, nekatere pa so odmrla.

Naš glavni cilj pri raziskavi je določiti glivo, ki povzroča odmiranje odraslih in mladih dreves in povzročiteljico nekroze mlade zelene skorje zelenega bora (*Pinus strobus*). Zato smo v nasadih iglavcev iz odmirajočih in obolelih rastlinskih delov, ki so kazali nekroze nabrali vzorce, ki smo jih zatem na Gozdarskem inštitutu mikroskopirali ter iz vzorcev z precepljanjem izolirali verjetne glivne povzročiteljice v čisto kulturo. Nadaljnje raziskave smo naredili s postopki molekularne analize DNA. Po končanih raziskavah smo izolate shranili v zbirko živih kultur na Gozdarskem inštitutu Slovenije in jih tudi vnesli v podatkovno zbirko *Boletus informaticus*.

V nasadih iglavcev smo z molekularno analizo vzorcev določili vrsto *Pezicula eucrita* ter vrsto *Pezicula* sp. ki sta verjetno vpleteni v nastanek nekroz ter posledično povzročata odmiranje skorje. Pri tem smo določili tudi glivo, ki se je večkrat pojavljala v okolini okuženih dreves, to je žoltorobi rjavopor – *Phaeolus schweinitzii* (*Basidiomycota*), ki povzroča bolezen vzdolžno trohnobo iglavcev. Domnevamo, da žoltorobi rjavopor, povzroča močno okuženost koreninskega sistema zelenih borov v nasadu Mlake, hiranje mladih in starih dreves ter njihovo odmiranje. Na drevesih, ki odmirajo zaradi vzdolžne trohnobe iglavcev, se na mladi skorji pojavijo nekroze, ki jih povzroča lahko slabo patogena gliva *Pezicula eucrita* ali druga neidentificirana vrsta iz rodu *Pezicula*.

## 9 VIRI

Abeln E.C.A., de Pagter M.A., Verkley G.J.M. 2000. Phylogeny of Pezicula, Dermea and Neofabraea inferred from partial sequences of the nuclear ribosomal RNA gene cluster. *Mycologia* 92,: 685-693

Butin H. 1995. Tree diseases and disorders. Causes, biology and control in forest and amenity trees. Oxford, Oxford University Press: 261 str.

Brus R. 2004. Dendrologija za gozdarje. Ljubljana. Oddelek za gozdarstvo in obnovljive vire – Biotehniška fakulteta: 408 str.

Genomic DNA from plant: User manual – Nucleospin Plant II. 2013. Düren, Macherey-Nagel: 37 str.

Gozdno gospodarski načrt gozdnogospodarske enote Metlika 2008 – 2017. Ljubljana, Zavod za gozdove Slovenije, Območna enota Novo mesto: 112 str.

Gozdnogojitveni načrt, gozdnogospodarske enote Metlika 2012. Črnomelj, Zavod za gozdove Slovenije.

Gobarsko društvo Lisička Maribor. 2005

<http://www.gobe.si/Gobe/PhaeolusSchweinitzii> (19. avgust. 2015)

Hawksworth D.L. 1974. Mycologist Handbook: an Introduction to the Principles of Taxonomy and Nomenclature in the Fungi and Lichens. Kew, Surrey, England, Commonwealth Mycological Institute: 231 str.

Hočevar S. 1983. Zdravstveno stanje hitrorastočih iglavcev v nasadih v Beli krajini

[http://www.zdravgozd.si/pdp\\_porocila\\_predogled.aspx?idgk=p53](http://www.zdravgozd.si/pdp_porocila_predogled.aspx?idgk=p53) (25. avgust 2015)

Index Fongorum. 2008

<http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=192875>

(18. avgust 2015)

Jurc, D. Ekofiziološke značilnosti glive *Cenangium ferruginosum* Fr. na borih.

Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za gozd. in obn. gozdne vire, 2003. XIV, 141 str.+ pril.

Maček J. 2008. Gozdna fitopatologija. Ljubljana, Zavod za gozdove Slovenije, Zveza gozdarskih društev Slovenije, Gozdarska založba: 448 str.

Multiple Sequence Alignment by MAFFT. 2015

<http://align.genome.jp/mafft> (10. avgust 2015)

National Center for Biotechnology Information. 2015  
[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) (10. avgust 2015)

Piškur B. 2014. Zbirka živih kultur Laboratorija za varstvo gozdov na Gozdarskem inštitutu Slovenije (ZLVG). Novice iz varstva gozdov, 7: 16–18

Stucky B. J. 2012. SeqTrace: a graphical tool for rapidly processing DNA sequencing chromatograms. Journal of Biomolecular Techniques., 23: 90-93.

Sigler L., Allen T., Lim S.-R., Berch S. and Berbee M. 2005. Two new *Cryptosporiopsis* species from roots of ericaceous hosts in western North America. Studies in Mycology, 53, 53-62

Technical Bulletin – Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Part#TB308. 2009.  
Madison, Promega Corporation: 12 str.

Verkley, G.J.M. 1999. A monograph of the genus *Pezicula* and its anamorphs. Studies in Mycology, 44:\_1-180

Zhilin Yuan, Gerard J.M. Verkley, *Pezicula neosporulosa* sp. nov. (Helotiales, Ascomycota), an endophytic fungus associated with *Abies* spp. in China and Europe, Mycoscience, 56, 2,: 205-213

White T., Bruns T., Lee S., Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. V: PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. San Diego, CA: Academic Press: 315–322

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se svojemu mentorju prof. dr. Dušanu Jurcu, ki me je nudil vso strokovno pomoč in nasvete pri izdelavi diplomskega dela.

Zahvaljujem se tudi somentorci dr. Barbari Piškur, ki je zame izvedla molekularne analize ter vso potrebno dokumentacijo.

Zahvaljujem se tudi recenzentu prof. dr. Robertu Brusu za hiter pregled diplomskega dela.

Zahvala gre tudi Gozdarskemu Inštitutu Slovenije za nemoteno opravljanje dela v prostorih Laboratorija za varstvo gozdov.

Najlepša hvala tudi moji družini, ki mi je omogočila študij ter me v času pisanja ves čas spodbujala in stala ob strani.

## PRILOGE

Priloga A: Nukleotidna zaporedja regije ITS rDNA, ki smo jih določili tekom naše raziskave

>Seq1 [organism=Pezicula sp.] 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), specimen voucher ZLVG468

AACCTGCGGAGGGATCATTACAGAGACTCGCCCTTGGGTAGACCTCCCAC  
CCTGTGTCGTTAACCTTTGTTGCTTGGCGGGCCGCAGCGGGCTCCGGCCCC  
GCCCTGGCTCGCGAGGGCGTCCCCGCCAGAGGACCCCCAAACCTGAATG  
TTAGTGTGCTTGAGTACTATAGAATAGTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTT  
GGTCTGGCATCGATGAAGAACGCGAACATGCGATAAGTAATGTGAATTGC  
AGAATTCACTGAATCATCGAATCTTGAACGCACATTGCGCCCTCGGTATT  
CGGGGGCATGCCTGTCGAGCGTCATTACAACCCTCAAGCTCTGCTTGGCTT  
GGCGTCACCGGCCCCGGTGTGCCCTAAAGCCAGTGGCGCGCCGTCTGGCT  
CTAACCGTAGTACACACTCTCGCTATGGACGCCGGCTGCTCGCCAGCAA  
CCCCCATCTATCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAACCGCTGAAC  
TAAGCATATCAATA

>Seq2 [organism=Pezicula eucrita] 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), specimen voucher ZLVG469

CTGGAGGGATCATTACAGAGACTCTGCCCTTGGGTAGACCTCCCACCCCTGT  
GTCGTTAACCTCTGTTGCTTGGCGGGCCGGGGCTCCGGCCCCGCCCCCTGG  
CTCCGGCTAGGGCGCCGCCAGAGGACTACCAAACCTGAATGTTAGTGTG  
GTCTGAGTACTATGTAATAGTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGG  
CATCGATGAAGAACCGCAGCGAACATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCA  
GTGAATCATCGAATCTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGGGGGGC  
ATGCCTGTTGAGCGTCATTACAACCCTCAAGCTCTGCTTGGCTTGGCTCAAGCGT  
CCGGTCCCCGGTGTGCCCTAAACTCAGTGGCGGCCGTCTGGCTCAAGCGT  
AGTACATACTCTCGCTACAGACGCCGGGATGCTGGCCAGCAACCCCCAAT  
CTATCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAACCGCTGAACCTAAC  
CA

>Seq3 [organism=Pezicula eucrita] 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), specimen voucher ZLVG470

TGCGGAGGGATCATTACAGAGACTCTGCCCTTGGGTAGACCTCCCACCCCTGT  
GTCGTTAACCTCTGTTGCTTGGCGGGCCGGGGCTCCGGCCCCGCCCCCTGG  
CTCCGGCTAGGGCGCCGCCAGAGGACTACCAAACCTGAATGTTAGTGTG  
TCTGAGTACTATGTAATAGTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGC  
ATCGATGAAGAACCGCAGCGAACATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCA  
GTGAATCATCGAATCTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGGGGGGC  
ATGCCTGTTGAGCGTCATTACAACCCTCAAGCTCTGCTTGGCTTGGCTCAAGCGT  
CCGGTCCCCGGTGTGCCCTAAACTCAGTGGCGGCCGTCTGGCTCAAGCGT  
AGTACATACTCTCGCTACAGACGCCGGGATGCTGGCCAGCAACCCCCAAT  
CTATCAAGGT

>Seq4 [organism=Pezicula sp.] 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), specimen voucher ZLVG471

TGCGGAGGGATCATTACAGAGTCGTGCCCTCGGGGTAGACCTCCCACCCTG  
TGTCTTACCTTTGTTGCTTGGCGGGCCGCGCGCGCTCCGGCCCCGCC  
CTGGCTCGCGAGGGCGTGCCGCCAGAGGACCCCCAAACCTGAATGTTAG  
TGTCTGAGTACTATAGAATAGTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTT  
CTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGA  
ATTCAGTGAATCATCGAATCTTGAACGCACATTGCGCCCTCGGTATTCCGGG  
GGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTACAACCCCTCAAGCTCTGCTGGTCTGGC  
GTCACCGGCCCGGTGTGCCCTAAAGCCAGTGGCGGCCGTCTGGCTCTAA  
GCGTAGTACACACTCTCGCTATGGACGCCGGCGCTCGCCAGCAACCCC  
CATCTATATCAAGGTTGACCTCGGATCA

>Seq5 [organism=Pezicula sp.] 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), specimen voucher ZLVG472

TGCGGAGGGATCATTACAGAGTCGTGCCCTCGGGGTAGACCTCCCACCCTG  
TGTCTTACCTTTGTTGCTTGGCGGGCCGCGCGCGCTCCGGCCCCGCC  
CTGGCTCGCGAGGGCGTGCCGCCAGAGGACCCCCAAACCTGAATGTTAG  
TGTCTGAGTACTATAGAATAGTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTT  
CTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGA  
ATTCAGTGAATCATCGAATCTTGAACGCACATTGCGCCCTCGGTATTCCGGG  
GGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTACAACCCCTCAAGCTCTGCTGGTCTGGC  
GTCACCGGCCCGGTGTGCCCTAAAGCCAGTGGCGGCCGTCTGGCTCTAA  
GCGTAGTACACACTCTCGCTATGGAGGCCGGCGCTCGCCAGCAACCCC  
CATCTATATCAAGG