

Zajednica gljiva u hodničnom sustavu jelinog valjkastog srčikara, *Treptoplatypus oxyurus* (Dufour, 1843)

Žgela, Lucija

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:108:246426>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-24**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU, FAKULTET ŠUMARSTVA I DRVNE
TEHNOLOGIJE
ŠUMARSKI ODSJEK
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ
URBANO ŠUMARSTVO, ZAŠTITA PRIRODE I OKOLIŠA**

LUCIJA ŽGELA

**ZAJEDNICA GLJIVA U HODNIČNOM SUSTAVU JELINOG
VALJKASTOG SRČIKARA, *Treptoplastypus oxyurus* (DUFOUR,
1843)**

DIPLOMSKI RAD

ZAGREB, 2021.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU, FAKULTET ŠUMARSTVA I DRVNE
TEHNOLOGIJE**

ŠUMARSKI ODSJEK

**ZAJEDNICA GLJIVA U HODNIČNOM SUSTAVU JELINOG
VALJKASTOG SRČIKARA, *Treptoplastypus oxyurus* (DUFOUR, 1843)**

DIPLOMSKI RAD

Diplomski studij: Urbano šumarstvo, zaštita prirode i okoliša

Predmet: Integrirana zaštita šuma u zaštićenim područjima

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

Student: Lucija Žgela

JMBAG: 0068223222

Broj indeksa: 1096/19

Datum odobrenja teme: 4. svibnja 2021.

Datum predaje rada: 6. rujna 2021.

Datum obrane rada: 10. rujna 2021.

Zagreb, rujna 2021.

Dokumentacijska kartica

Naslov	Zajednica gljiva u hodničnom sustavu jelinog valjkastog srčikara, <i>Treptoplatypus oxyurus</i> (Dufour, 1843)
Title	Mycobiota in the galleries of the fir pinhole borer <i>Treptoplatypus oxyurus</i> (Dufour, 1843)
Autor	Lucija Žgela
Adresa autora	A. G. Matoša 14 B, 47 000 Karlovac
Mjesto izrade	Fakultet šumarstva i drvne tehnologije Sveučilišta u Zagrebu
Vrsta objave	Diplomski rad
Mentor	Prof. dr.sc. Boris Hrašovec
Komentorica	Dr. sc. Jelena Kranjec Orlović
Godina objave	2021.
Obujam	36 stranica, 19 slika, 8 tablica, 1 grafikon, 22 navoda literatura
Ključne riječi	<i>Treptoplatypus oxyurus</i> , jelin valjkasti srčikar, zajednica gljiva, simbioza
Key words	<i>Treptoplatypus oxyurus</i> , ambrosia beetle, fungal community, symbiosis
Sažetak	Jelin valjkasti srčikar (<i>Treptoplatypus oxyurus</i>) je jedan od dvije palearktičke vrste srčikara koji obitava u Hrvatskoj dok u susjednim zemljama nije otkriven. Biologija kukca nije dovoljno istražena u Hrvatskoj, ali i u svijetu stoga je važno nastaviti pratiti i istraživati biologiju i uvjete pridolaska vrste. Pripada redu kornjaša koji napada i oštećuje drvo jele (obične i grčke) u kojem buši hodnike. Sva istraživanja koja su provedena ukazuju na obligatni odnos jelinog valjkastog srčikara s gljivama stoga je napravljena mikobiološka obrada uzoraka drva uzetih sa zaražene jele. Unutar istražene zajednice gljiva koje dolaze u hodničnom sustavu kukca, najzastupljenija je skupina kvasaca (<i>Candida</i> sp.) i vrsta crvenorubna guba (<i>Fomitopsis pinicola</i>).
Abstract	Ambrosia beetle (<i>Treptoplatypus oxyurus</i>) is one of the two Palearctic species of wood-boring weevils which inhabit forests of Croatia, while it has not been detected in adjoining countries. Biology of ambrosia beetles has not been sufficiently researched in Croatia nor in the world, so it is important to continue monitoring and researching biology and habitat conditions of the species. It is classified in the genus of beetles that attack and damage fir wood (specifically of silver and black mountain fir) in which it bores galleries. All research to date indicates symbiosis between ambrosia beetle and fungi, therefore mycobiological processing of infected fir wood specimens was performed. Within researched fungal community that appears in the galleries of the insect, the most common are yeasts (<i>Candida</i> sp.) and the red-belted bracket (<i>Fomitopsis pinicola</i>).

	IZJAVA O IZVORNOSTI RADA	OB ŠF 05 07
		Revizija: 1
		Datum: 10. 09. 2021.

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

Lucija Žgela

U Zagrebu, 10. rujna 2021.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Simbioza potkornjaka i gljiva.....	5
1.1.1. Simbioza <i>Ambrosia</i> gljiva i pripadnika potporodice Platypodinae.....	6
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	10
3. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA	11
3.1. Izolacija gljiva na hranjive podloge.....	12
3.2. Presađivanje gljiva u čiste kulture	14
3.3. Grupiranje micelija u morfotipove	15
3.4. Izolacija DNK.....	17
3.5. PCR i elektroforeza	19
4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA	22
4.1. Zajednica gljiva u hodničnom sustavu potkornjaka <i>T. oxyurus</i>	24
5. RASPRAVA.....	30
5.1. Identificirane vrste gljiva.....	31
5.2. Slaba uspješnost identifikacije taksona gljiva	32
6. ZAKLJUČAK	34
7. LITERATURA.....	35

Popis slika

Slika 1. Mužjak jelinog valjkastog srčikara (Hrašovec, 2011)	2
Slika 2. Rasprostranjenost jelinog valjkastog srčikara palearktičke ekozone (označeno crvenom bojom), rasprostranjenost obične i grčke jele (označeno zelenom bojom)	2
Slika 3. Ličinka jelinog valjkastog srčikara u hodničnom sustavu (foto: Hrašovec)	3
Slika 4. Mikangij hrastovog valjkastog srčikara: (a) mikangij ženke, (b) mikrofotografija mikangija ženke, (c-d) mikangij mužjaka, (d) pokrovne jamice mikangija unutar kojih su guste mreže spora <i>Ambrosia</i> gljiva, (e) micelij <i>Ambrosia</i> gljiva probio na površinu vratnog štita uginulog kukca (Inacio, M. L., Marcelino, J., Lima, A., Sousa, E., Nobrega, F., 2021: <i>Raffaella quercina</i> sp. nov. Associated with Cork Oak (<i>Quercus suber</i> L.) Decline in Portugal).....	4
Slika 5. Mikangij ženke jelinog valjkastog srčikara (foto: Hrašovec)	5
Slika 6. Uzorak debla zaražene jele prije cijepanja i mikološke obrade	11
Slika 7. Početak mikološke obrade uzoraka jele u laminarnom kabinetu	12
Slika 8. Pomoćne tvari korištene za obogaćivanje MEA hranjive podloge: (a) streptomycin – antibiotik, (b) cikloheksimid – fungicid / fungistatik.....	13
Slika 9. Izolirani miceliji gljiva u Petrijevim zdjelicama na hranjivoj podlozi.....	14
Slika 10. Grupiranje micelija u morfotipove.....	16
Slika 11. Uređaj Tissue Lyser za homogenizaciju micelija u epruvetama.....	17
Slika 12. Mikroeprevete sa uzorcima DNK	18
Slika 13. Postupak sušenja DNK u termobloku	19
Slika 14. Uređaj za PCR sa ukupno 27 uzoraka: 26 uzoraka DNK i jednim kontrolnim	21
Slika 15. Elektroforetska analiza PCR produkata na agaroznom gelu (foto: Kranjec Orlović).....	24
Slika 16. Kulture gljive <i>Candida</i> sp. (označeno crnim obrubom)	26
Slika 17. Čiste kulture morfotipova identificiranih kao <i>Fomitopsis pinicola</i>	27
Slika 18. Čista kultura <i>Sugiyammaella chiloensis</i> (obilježeno crvenim obrubom).....	27
Slika 19. Čiste kulture plijesni dobivenih iz uzoraka hodnika	29

Popis tablica

Tablica 1. Zajednica gljiva u hodničnom sustavu pripadnika potporodice Platypodinae (Joseph i Keyhani, 2021)	8
Tablica 2. Zajednica gljiva u asocijaciji s hrastovim valjkastim srčikarom (Henriques i sur., 2006)	9
Tablica 3. Vrijednosti volumena pojedinih sastojaka smjese za PCR	20
Tablica 4. Uvjeti lančane reakcije polimerazom (PCR).....	20
Tablica 5. Uzorci micelija obuhvaćeni pojedinim morfotipom	23
Tablica 6. Popis dobivenih vrsta gljiva	25
Tablica 7. Morfotipovi i pretpostavljene najsvrodnije vrste niskih podudarnosti i pokrivenosti sekvenci.....	28
Tablica 8. Popis morfotipova čiji PCR produkti nisu uspješno sekvencirani	28

Popis grafikona

Grafikon 1. Broj izoliranih micelija prema dubini položaja hodnika promatrano od srži prema kori jelinog debla	22
--	----

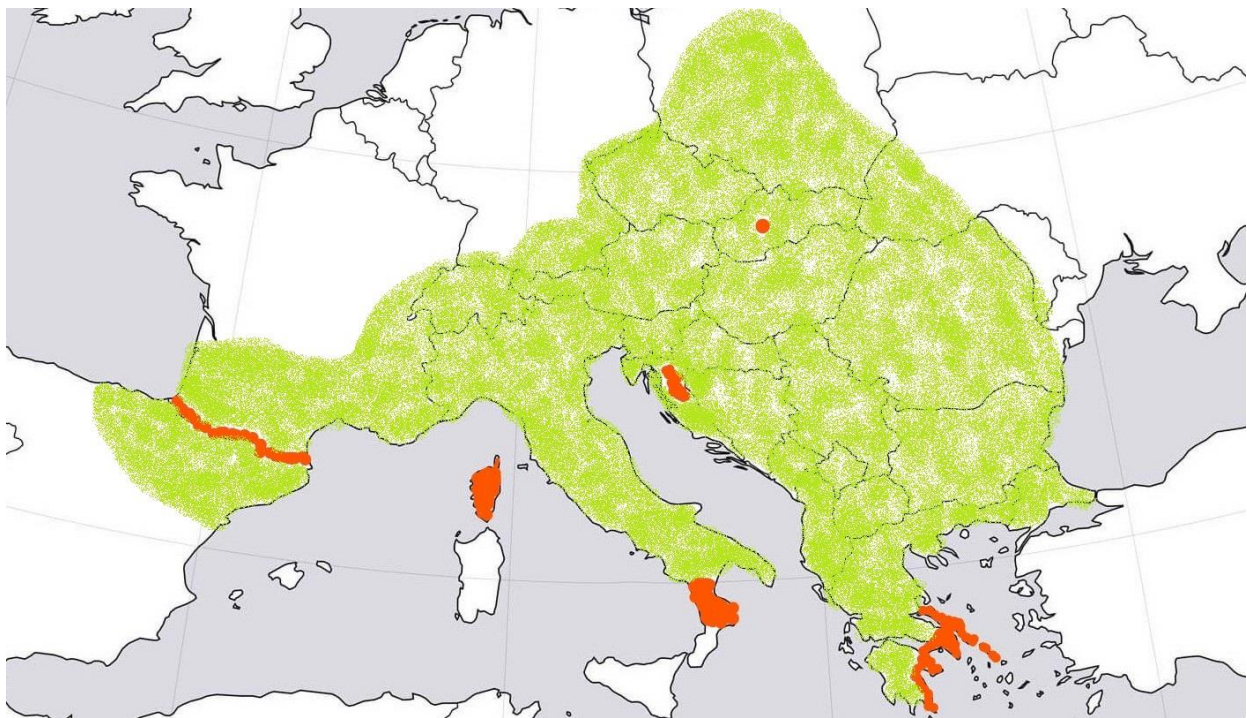
1. UVOD

Jelin valjkasti srčikar (*Treptoplatypus oxyurus* Dufour, 1843) pripada redu kornjaša (Coleoptera), podredu Polyphaga, porodici srčikara (Platypodidae), potporodici Platypodinae i rodu *Treptoplatypus* (Beaver, 1998, prema: Wood, 1993).

T. oxyurus razmjerno je recentno otkrivena Palearktički autohtona vrsta srčikara za Hrvatsku. Prvi mužjak vrste (Slika 1) ulovljen je pomoću feromonske klopke slučajno u Nacionalnom parku Sjeverni Velebit 2010. godine, a zaraženi jelovi trupci otkriveni su u šumariji Krasno ujesen 2011. godine. U dva zaražena trupca uočeni su spolno zreli oblici s gusto naseljenim ličinkama. *T. oxyurus* je kornjaš koji je svojom biologijom vezan isključivo za drvo obične i grčke jele. Pretpostavlja se da pridolazi samo u jelovim sastojinama prašumske strukture. Fragmentarno je rasprostranjen u Palearktičkoj regiji (Slika 2) nastaloj u geološkom razdoblju paleogena koja obuhvaća područje Europe, Sredozemlja, sjeverne Afrike i Azije. Na području Europe zabilježen je u Pirenejima, Korzici, jugu Italije i Grčke, u Slovačkoj i odnedavna, u Hrvatskoj. Za sada, u susjednim zemljama, Sloveniji i Bosni i Hercegovini, njegov pridolazak nije zabilježen. Također, nije zabilježen niti u širem okruženju Hrvatske iako sastojine jele prirodno dolaze na tim područjima, npr. Austrija, Švicarska, Češka, Poljska, Rumunjska, Bugarska, Albanija, Makedonija (Hrašovec i Franjević, 2011).



Slika 1. Mužjak jelinog valjkastog srčikara (Hrašovec, 2011)



Slika 2. Rasprostranjenost jelinog valjkastog srčikara palearktičke ekozone (označeno crvenom bojom), rasprostranjenost obične i grčke jele (označeno zelenom bojom)

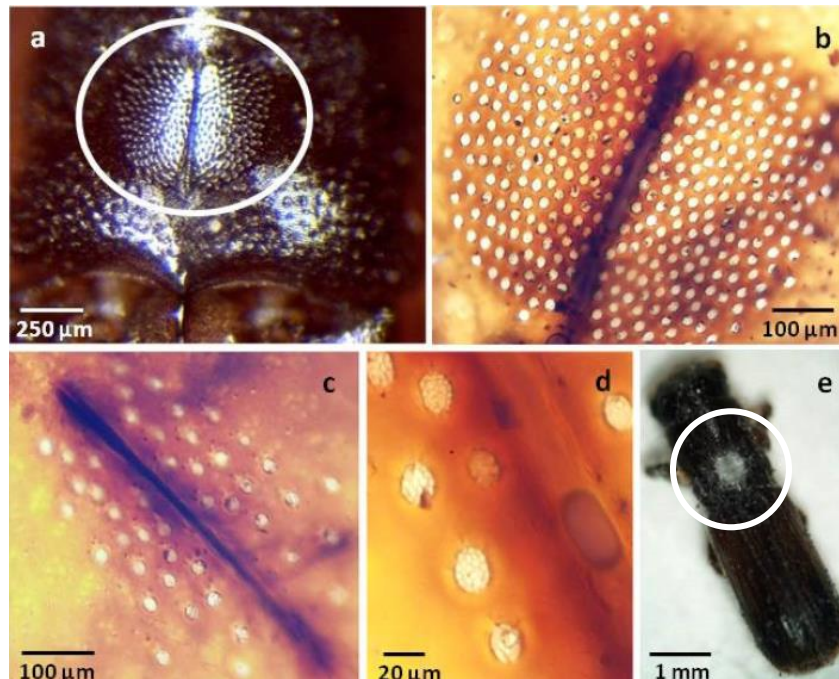
U Hrvatskoj je *T. oxyurus* otkriven u bukovo - jelovim sastojinama nacionalnih parkova (NP Sjeverni Velebit, NP Risnjak i NP Plitvička jezera) u kojima formira dugačke, nepravilne i vijugave hodnike u drvu obične jele. U hodnicima su pronađeni odrasli ljetvičari, ženke koje polažu jaja mutno bijele boje i mnoštvo ličinki blijedo žute boje (Slika 3). Kao i svaki pripadnik Platypodinae, obligatni je ksilomicetofag (u simbiozi s gljivama) i općenito, smatra se rijetkom i ugroženom vrstom. Hrpice bijele nitaste piljevine na jelovim deblima u kasno ljeto i jesen predstavljaju jedan od pouzdanih diferencijalnih simptoma napada. Jelin valjkasti srčikar je nova vrsta u Hrvatskoj i nedovoljno istražena, stoga dosadašnja istraživanja biologije i eventualne šire rasprostranjenosti treba intenzivirati i svakako nastaviti (Hrašovec, 2011).



Slika 3. Ličinka jelinog valjkastog srčikara u hodničnom sustavu (foto: Hrašovec)

Unutar reda Coleoptera, prema štetnosti i uspješnosti nastanjivanja stabala, ističu se dvije skupine ksilofaga i ksilomicetofaga: Scolytinae i Platypodinae. Unutar podporodice srčikara, u Hrvatskoj uz *T. oxyurus*, pridolazi još samo jedna autohtona palearktička vrsta, *Platypus cylindrus* (Fabricius, 1792) - hrastov valjkasti srčikar. *P. cylindrus* polifagni je kornjaš koji napada hrastove, bukvu, jasen, lipu, pitomi kesten i trešnju. Odrasle jedinke su smeđe boje, produženog, valjkastog tijela pokrivenog rijetkim žućkastim dlačicama. Adulti se roje početkom ljeta. Oštećuje drvo u kojem izgriza dugačke i zavojite hodnike. Ženka u hodnicima odlaže jaja, a mužjak izbacuje preostalu piljevinu. Ličinke nakon hranjenja i dosizanja posljednjeg stadija izgrizaju kratak hodnik sa zipkom u kojoj se kukulje krajem jeseni. Ima jednu generaciju godišnje.

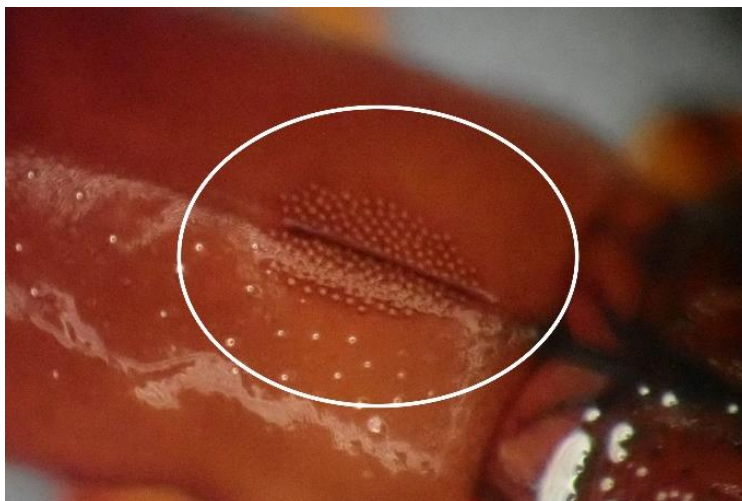
Oba kukca, jelin i hrastov valjkasti srčikar, su u obligatnom odnosu s *Ambrosia* gljivama koje prenose pomoću specijaliziranog organa – mikangija ili micetangija (*mycangia*) (Slika 4) koji se kod ovih vrsta nalazi na leđnoj strani vratnog štita (Cassier i sur., 1995; Hrašovec i Franjević, 2011).



Slika 4. Mikangij hrastovog valjkastog srčikara: (a) mikangij ženke, (b) mikrofotografija mikangija ženke, (c-d) mikangij mužjaka, (d) pokrovne jamice mikangija unutar kojih su guste mreže spora *Ambrosia* gljiva, (e) micelij *Ambrosia* gljiva probio na površinu vratnog štita uginulog kukca (Inacio i sur., 2021)

Usporedba mikangija jelinog i hrastovog valjkastog srčikara ukazuje na neke sličnosti i razlike. Mikangij kod hrastovog valjkastog srčikara jajolika je oblika, smješten na zaravnjenoj sredini gornjeg dijela vratnog štita. Zabilježen je kod oba spola. Dimenzijom je veći kod ženki (460 x 530 μm), nego kod mužjaka (140 x 140 μm). Sastoji se od sferoidnih šupljina koje su ispunjene okruglim sporama (obligatna simbioza kukca i gljive). Kutikularna površina između šupljina je relativno glatka i ispunjena žlijezdama što ukazuje na prostornu odvojenost mikangijalnih šupljina i osjetilnih čvorova. Anatomska građa i detaljna struktura mikangija ukazuje na evolucijski najrazvijeniju formu mutualizma potkornjaka i gljiva (Cassier i sur., 1995).

Mikangij *T. oxyurus* sličan je gornjem opisu, a najjasnija razlika u odnosu na *P. cylindrus* ogleda se u srcolikom obliku mikangija na vratnom štitu ženke (Slika 5).



Slika 5. Mikangij ženke jelinog valjkastog srčikara (foto: Hrašovec)

1.1. Simbioza potkornjaka i gljiva

Simbioza u varijanti mutualizma oblik je uzajamne interakcije dvaju različitih vrsta organizama kod kojih jedna vrsta u ovom međudonosu „pruža uslugu“ koju druga vrsta ne može uopće izvesti ili u tom smislu ima poteškoća (Wikipedia). „Usluge“ koje razmjenjuju gljive i potkornjaci u uzajamnoj interakciji su: prehrana, zaštita i širenje. U ektosimbiozi, kukci često konzumiraju gljive dok gljive mogu razgraditi biljne polimere ili obrambene spojeve čime supstrat učine dostupan potkornjacima za konzumaciju. Također, gljive mogu pružiti zaštitu od okolišnih čimbenika i proizvesti spojeve štetne za druge (antagonističke) mikroorganizme. Potkornjaci raznose gljive u hodnicima u deblu čime olakšavaju i ubrzavaju njihovu disperziju, osiguravaju supstrat za rast gljiva i zaštitu. Mutualizam gljiva i potkornjaka može prijeći iz fakultativnog u obligatni pri čemu oba organizma više nisu sposobna preživljavati samostalno. Obligatni mutualizam rezultira razvojem morfoloških prilagodbi kod kukaca i gljiva, razvojem socijalnog ponašanja u pojedinim skupinama i gubitkom spolnosti kod pojedinih mutualističkih gljiva.

Pojedini potkornjaci prenose gljivične simbioante i spore iz svog legla u novog domaćina - stablo, u visoko selektivnim organima, mikangijima. Gljive dodatno pridonose prehrani potkornjaka dušikom i sterolima. (Biedermann i Vega, 2020).

Potkornjaci iz roda *Dendroctonus* vrlo često su u simbiotskom odnosu sa gljivama i bakterijama. Najčešće gljive koje dolaze u hodnicima *Dendroctonus* spp. su kvasci – *Candida* spp., *Cyberlindnera* spp. Popis gljiva koje su zabilježene u hodnicima potkornjaka iz roda *Dendroctonus*: *Acanthophysium cerussatum*/*Stereum gausapatum*, *Candida piceae*, druge neidentificirane vrste *Candida*, *Cyberlindnera americana*, *Hypocrea muroiana*/*Trichoderma viride*, *Penicillium charlesii*/*P. pulvis*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium corylophilum*, *Penicillium decumbens*, *Penicillium purpurogenum*, *Talaromyces purpurogenus* i druge neidentificirane vrste, poput *Penicillium* sp., *Talaromyces radicus*, *T. variabilis*, *Pichia bispora*/*Yeast* sp. (Dohet i sur., 2016).

Kao primjer mutualizma potkornjaka drvaša i nekih *Ambrosia* gljiva može poslužiti vrsta *Xylosandrus crassiusculus*. To je recentna invazivna vrsta potkornjaka drvaša koji se širi Europom, a koji je u simbiotskom odnosu s ambrozija gljivama (*Ambrosia* spp.) i njegove se ličinke hrane micelijem ovih gljiva. Gljive iz roda *Ambrosia* su vrlo agresivne, invazivne i patogene te rade velike štete biljci. Prodiru u ksilem gdje crpe hranjive tvari i nakupljaju ih na površini hodnika za ishranu potkornjacima.

1.1.1. Simbioza *Ambrosia* gljiva i pripadnika potporodice Platypodinae

Ovaj se oblik simbioze sastoji od tzv. ambrozija kukaca (kornjaša) koji su specijalizirani za izgrizanje drvene tvari i zajednice gljiva od kojih su najznačajnije iz roda *Ambrosia*. Gljive se do hodnika u drvu stabla (domaćina) transportiraju u specijaliziranim strukturnim depresijama mikangijima ili micetangijima smještenima na području vratnog štita.

Ambrosia gljive su dimorfne i mogu rasti u dva oblika: ambrozijskom (poput kvasaca) i/ili kao micelij. Smatra se da je ambrozijska forma nastala kao rezultat prilagodbe gljiva na kontakt sa adultima i ličinkama. Specijalizirane su i prilagođene određenim vrstama kukaca i stanišnim uvjetima.

U hodničnim sustavima kukaca, uz *Ambrosia* gljive pridolaze i drugi rodovi gljiva (npr. saprofiti) te se pretpostavlja da zajednički pospješuju napad i kolonizaciju pojedine vrste kukca. Podijeljene su na primarne i pomoćne.

Primarne su usko vezane uz kukce simbiozom i transportom te njihova raspodjela ovisi o simbiontu. Dominantne su u hodničnim sustavima kukca s kojim su u simbiozi i vrlo često služe kao hrana mladim ličinkama. Kukac im pruža zaštitu izolacijom i transportom u mikangiju do drugog potencijalnog domaćina. Primarne ambrozijske gljive su obligatni simbionti i vrlo su osjetljive na sušu te ih je teško pronaći izvan hodničnih sustava potkornjaka ili mikangija. Pomoćne *Ambrosia* gljive su privremene, prolazne i nisu specijalizirane potrebama simbionta, a mogu se nastaniti i nakon razvoja jedne generacije kukca. Nisu obligatne ličinkama i ne transportiraju se u mikangijima, nego imaju sluzave spore pomoću kojih se prenose na vanjskim dijelovima tijela različitih organizama uključujući i kukce. Oportunističke su gljive i većinu vrsta se lako uzgaja u laboratoriju, ali su česte zamjene sa primarnim vrstama *Ambrosia* gljiva. Taksonomski su ambrozija gljive podijeljene unutar četiri roda: *Ambrosiella*, *Raffaella*, *Monacrosporium* i *Phialophoropsis*. Značajni su i rodovi: *Fusarium*, *Acremonium*, *Candida* i *Graphium* te rodovi kvasaca *Ascoidea* i *Endomycopsis* (Batra, 1985; Henriques i sur., 2006).

Potporodica Platypodinae (Wood & Bright 1993) obuhvaća više od 1400 vrsta unutar 34 roda podijeljenih u 4 plemena: Tesserocerini, Platypodini, Mecopelmini i Schedlariini. Areal potporodice je ograničen i mozaičan, tj. fragmentarno je rasprostranjena s rodovima koji nastanjuju samo jedan kontinent ili čak samo jedan otok (npr. Madagaskar). Samo osam rodova je pronađeno na više od jednog kontinenta. Većina pripadnika potporodice obitava u tropskoj i suptropskoj regiji. Osam vrsta iz potporodice pridolazi ili je otkriveno u južnom SAD-u, dvije vrste u južnoj Europi i nešto više u Argentini i južnoj Africi. Platypodinae obuhvaćaju veliki broj endema. Većina vrsta iz potporodice kultivira ambrozija gljive zbog hrane u svojim galerijama duboko u srži drva te njihov rast i razvoj ovise o njima. Vrste su uglavnom monogamne i mužjak ostaje u hodnicima drva do završnog razvojnog stadija ličinke. Ulaz u novi hodnični sustav je uvijek napravljen od strane mužjaka što ukazuje na jednu ženku u galeriji. Kopulacija se odvija na početku hodničkog sustava te ženka nakon oplodnje nastavlja izgrizati hodnike i na kraju glavnog hodnika odlaže jaja u skupinama. Ličinke se hrane ambrozija gljivama, a kukulje se u kolijevkama iskopanama okomito na glavni hodnik. Tijekom razvojnog ciklusa, mužjak pomaže ženki u čišćenju hodnika od grizotina i ekskremenata te čuva ulazni hodnik od predatora i parazitoida. Razvojni ciklus legla može trajati i do nekoliko godina zbog čega dolazi do preklapanja više različitih generacija u zajednice koje ukazuju na složenost socijalnog ponašanja i različitost uloga.

Kompleksno društveno ponašanje posebno se ističe kod australske vrste *Platypus incompertus* u čijim hodnicima neoplođene kćeri preuzimaju ulogu mužjaka koji ne ostaje u leglu i pomažu ženki zaštititi i bolje rasporediti jaja (Jordal, 2014).

Molekularnom filogenezom i biogeografijom potporodice Platypodinae istraženi su najznačajniji rodovi, njihova brojnost i korelacija. Utvrđena je povezanost plemena Tesserocerini s *Notoplatypus* kao sestriškom grupom. *Austroplatypus* je formirao sestrišne grupe s vrstama iz plemena Platypodini (Jordal, 2015).

Većina rodova iz potporodice Platypodinae nastanjuju oslabljene i umiruće drvenaste vrste, dok pojedine vrste iz roda *Platypus* koloniziraju drvo zdravih stabala, najčešće hrasta i topole. Mikangij je sitan s manjim jamama, brazdama i šupljinama, a u hodničnim sustavima i mikangiju uočeno je više rodova i vrsta gljiva (Tablica 1). Zajednice bakterija nisu istražene (Joseph i Keyhani, 2021).

Tablica 1. Zajednica gljiva u hodničnom sustavu pripadnika potporodice Platypodinae (Joseph i Keyhani, 2021)

Platypodinae		
Zajednica gljiva		Zajednica bakterija
ROD	FITOPATOGENA VRSTA	
<i>Raffaelea</i> (Ophiostomatales), <i>Ambrosiozyma</i> , <i>Candida</i> (Saccharomycetales)	<i>Raffaelea quercus-mongolicae</i> , <i>Raffaelea quercivora</i> , <i>Raffaelea</i> <i>santoroi</i>	Nije istražena

Henriques i sur. (2006), izolirali su nekoliko gljiva iz ženskih i muških mikangija, crijeva i egzoskeleta hrastovog valjkastog srčikara te iz hodničnih sustava u drvu hrasta plutnjaka (Tablica 2). Posebna pozornost posvećena je izoliranoj ambrozija gljivi *Raffaelea* kao primarnom simbiotu *P. cylindrus*.

Tablica 2. Zajednica gljiva u asocijaciji s hrastovim valjkastim srčikarom (Henriques i sur., 2006)

Gljiva	Hodnični sustav	Mikangij	Crijevo kukca	Egzoskelet
<i>Acremonium</i> sp.	X	X		X
<i>Aspergillus</i> spp.	X	X	X	X
<i>Fusarium</i> sp.	X			
<i>Gliocladium</i> spp.	X	X	X	X
<i>Mucorales</i>	X			X
<i>Nodulisporium</i> sp.	X			X
<i>Paecilomyces</i> sp.	X			X
<i>Penicillium</i> spp.	X	X	X	X
<i>Raffaelea</i> spp.	X	X	X	X
<i>Trichoderma</i> spp.	X	X	X	X
X - otkriveno				

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Treptoplatypus oxyurus rijetka je i razmjerno slabo istražena vrsta, stoga je postavljen cilj u želji za dodatnim istraživanjem njegove biologije i uvjeta pridolaska. Jedan od ciljeva istraživanja je bio potvrditi i dodatno istražiti obligatni mutualizam ovog srčikara i nepoznatog sastava simbiotskih gljiva. U tom smislu željelo se istražiti povezanost *Ambrosia* gljiva i ovog rijetkog srčikara. Glavni cilj istraživanja bio je utvrditi o kojim se gljivama radi, barem do razine roda ili eventualno vrste. Nadalje, htjelo se proučiti determiniranu zajednicu gljiva i učestalost pojedinih rodova ili vrsta. Uz pretpostavku je da su unutar hodničkog sustava različite grupacije gljiva s obzirom na udaljenost od ulaza u hodnik. Metodološki se to htjelo potvrditi pažljivim uzimanjem uzoraka. Po mogućnosti željelo se utvrditi i sličnost mikoflore hodnika i samih mikangija jelinog valjkastog srčikara pa je i taj aspekt bio metodološki obuhvaćen u laboratorijskom uzimanju uzoraka..

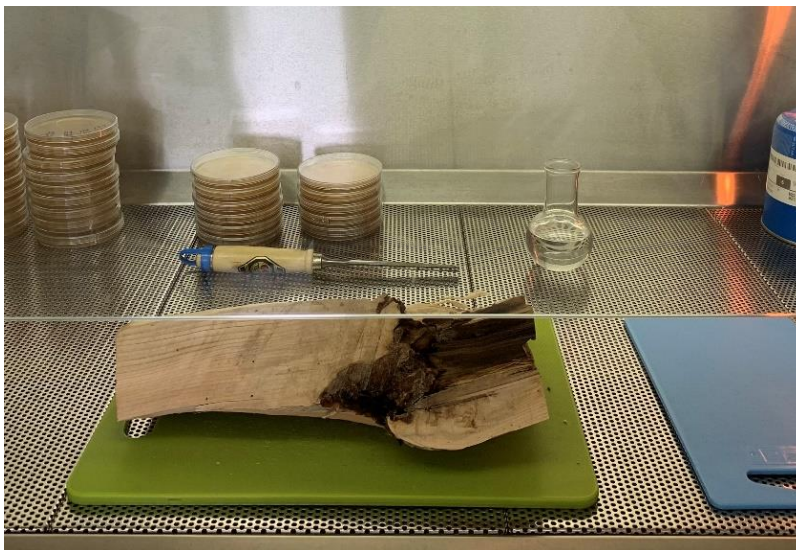
3. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA

Korišteni su uzorci debla obične jele (*Abies alba* Mill.) koja je srušena početkom studenog 2020. godine i uzorkovana 16. 3. 2021. godine u Nacionalnom parku Plitvička jezera. Zaraženi uzorak debla jele dopremljen je na daljnju obradu u Entomološki laboratorij Zavoda za zaštitu šuma i lovnog gospodarenja na Fakultetu šumarstva i drvne tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. U entomološkom laboratoriju je uzorak debla cijepan na manje komade 29. 3. 2021. (Slika 6). Cijepanje je obavljeno pažljivo zbog očuvanja hodničnih sustava jelinog valjkastog srčikara. Dobiveni komadi debla i pripadajući uzorci hodnika su prema dubini uzorkovanja, promatrajući od srži prema kori jelinog debla, svrstavani u kategorije D1, D2 ili D3. Dubina D1 se odnosila na prvih 8 cm debla od srži prema kori, dubina D2 na 8 do 16 cm, a dubina D3 na 16 do 34 cm od srži prema kori.



Slika 6. Uzorak debla zaražene jele prije cijepanja i mikološke obrade

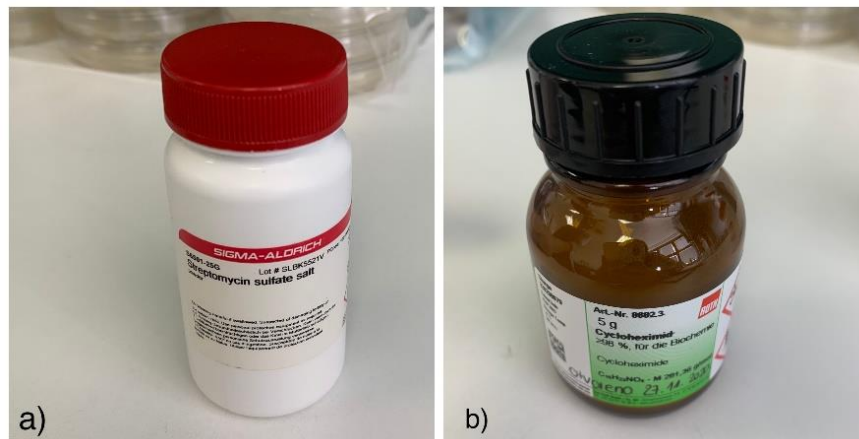
Dobiveni komadi debla sa hodnicima su odmah po cijepanju transportirani u laminarni kabinet za rad u atmosferi čistog zraka (u daljnjem tekstu: laminar) zbog sprječavanja kontaminacije tijekom mikološke obrade (Slika 7).



Slika 7. Početak mikološke obrade uzoraka jele u laminarnom kabinetu

3.1. Izolacija gljiva na hranjive podloge

Postupak izolacije je proveden 29. 3. 2021. godine u laminaru radi sprječavanja kontaminacije. Od alata korišteni su skalpel, pinceta, igla i daska za rezanje. Alat je steriliziran prije i poslije upotrebe, te između svakog uzorka hodnika. Sterilizacija je obavljena uranjanjem alata u 96 % etanol i kratkim izlaganjem alata plamenu. Za izolaciju su korištena dva tipa hranjivih podloga: MEA obogaćena streptomycinom (malt ekstrakt agar napravljen od ječmenog slada i antibiotik koji sprječava razvoj bakterija) i MEA obogaćena cikloheksimidom i streptomycinom (uz antibiotik korišten je i fungicid / fungistatik koji sprječava razvoj plijesni i pojedinih brzorastućih gljiva) (Slika 8).



Slika 8. Pomoćne tvari korištene za obogaćivanje MEA hranjive podloge: (a) streptomycin – antibiotik, (b) cikloheksimid – fungicid / fungistatik

Za izolaciju su birani hodnici bez prisutnosti plavkastog obojenja okolnog ksilema. Za svaki odabrani hodnik su skalpelom uzeta dva komadića stijenke hodnika u obliku sitnih četverokuta koji su naličjem položeni na hranjivu podlogu u Petrijevim zdjelicama te dva brisa unutrašnjosti hodnika iglom (igla je umetnuta i protrljana po stijenkama hodnika te zatim lagano po površini hranjive podloge). Na dubini D1 je uzorkovano devet hodnika (H1-H9) čiji su komadići ili brisevi unutrašnjosti postavljeni u 18 Petrijevih zdjelica (9 Petrijevih zdjelica na jednom i 9 na drugom tipu hranjive podloge). Na dubinama D2 i D3 su uzorkovana po tri hodnika (H10-H12 na D2 te H13-H15 na D3) čiji su komadići ili brisevi unutrašnjosti postavljeni u 6 Petrijevih zdjelica za svaku dubinu (3 na jednom tipu hranjive podloge i 3 na drugom). Dodatna dva uzorka kraja hodnika te jedan uzorak bijelog valjkastog micelija su postavljeni u zasebne tri Petrijeve zdjelice manjeg promjera (55 mm). Petrijeve zdjelice su ispisane simbolima koji označavaju broj uzorkovane jele, dubinu uzorka i broj hodnika (Slika 9). Nakon izolacije uzorci su skladišteni u plastičnu vrećicu koja je prebačena u komoru rasta u tamu na temperaturu od 22 °C.



Slika 9. Izolirani miceliji gljiva u Petrijevim zdjelicama na hranjivoj podlozi

Prva provjera dobivenih micelija je obavljena 1. 4. 2021. godine te su dva micelija iz Petrijevih zdjelica, J2 D1 H3 i J2 D1 H9, presađena zbog kontaminacije na MEA hranjivu podlogu. Miceliji su presađeni radi sprječavanja širenja plijesni na uzorak.

3.2. Presađivanje gljiva u čiste kulture

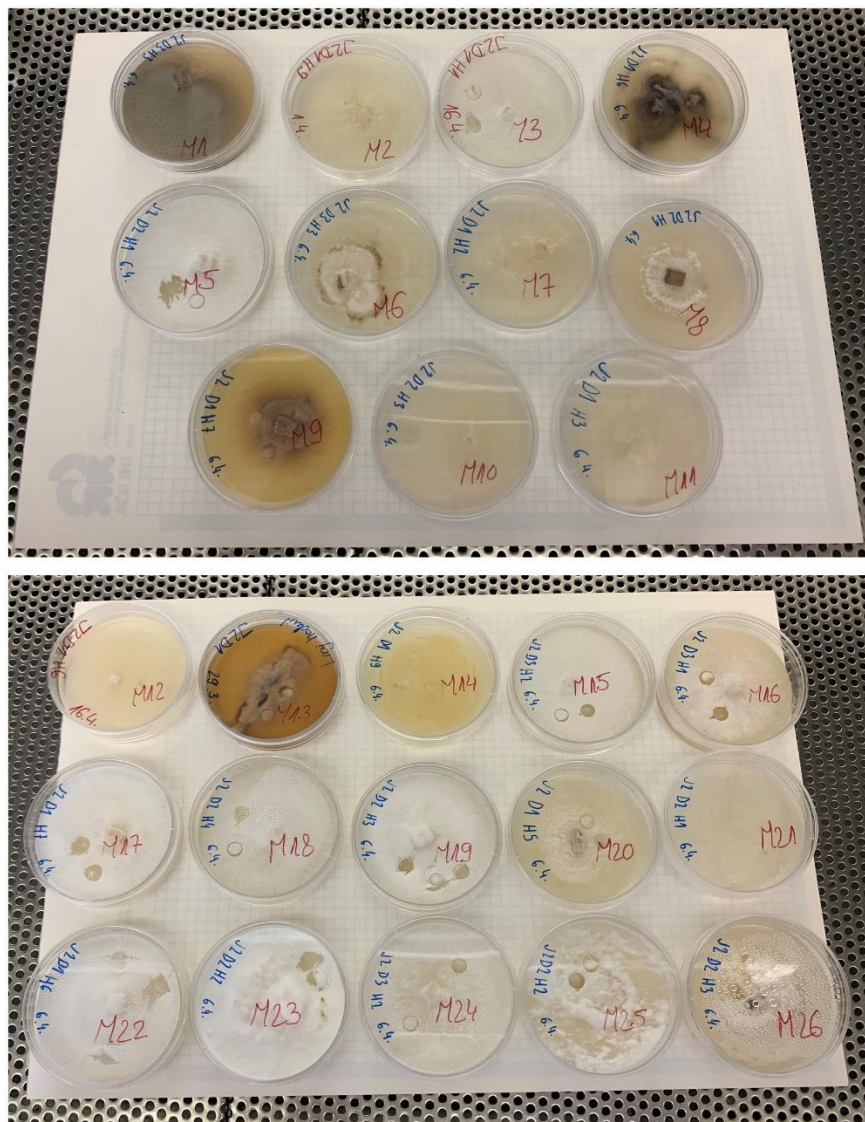
Presađivanje dobivenih micelija u čiste kulture je obavljeno prvi put 1. 4. 2021. i drugi put 6. 4. 2021. godine u laminaru. U zasebne Petrijeve zdjelice je presađeno ukupno 40 micelija gljiva, 37 iz većih Petrijevih zdjelica i tri iz manjih. Prednost je dana presađivanju micelija nastalih iz briseva iglom jer su to miceliji koji zasigurno potječu iz unutrašnjosti hodnika, a ne okolnog tkiva. Presađivanje je obavljeno sterilnim skalpelom kojim je uzet komadić hranjive podloge sa micelijem u obliku četverokuta, poželjno na rubu micelija zbog najintenzivnijeg rasta.

Uzeti komadić presađen je u novu Petrijevu zdjelicu sa MEA hranjivom podlogom tako da je micelij položen na površinu podloge. Presađeni miceliji su skladišteni u plastične vrećice i prebačeni u komoru rasta u kontrolirane uvjete (22 °C u tami).

Provjera micelija je obavljena 16. 4. 2021. godine i presađeno je dodatnih osam micelija u čiste kulture. Provjerom je uočeno da se radi o osam različitih vrsta gljiva.

3.3. Grupiranje micelija u morfotipove

Grupiranje čistih kultura micelija u morfotipove je obavljeno 18. 5. 2021. godine. Miceliji su grupirani na temelju međusobne morfološke sličnosti. Promatrane morfološke karakteristike su bile boja, tekstura micelija, obojenje hranjive podloge i brzina rasta. Za svaki utvrđeni morfotip je odabran jedan reprezentativni uzorak micelija za molekularnu identifikaciju vrste. Presađeno je 26 pretpostavljenih morfotipova u 26 mikroeproveta s ME (Malt Extract) tekućom hranjivom podlogom. Morfotipovi su obilježeni oznakama od M1 do M26 (Slika 10).



Slika 10. Grupiranje micelija u morfotipove

3.4. Izolacija DNK

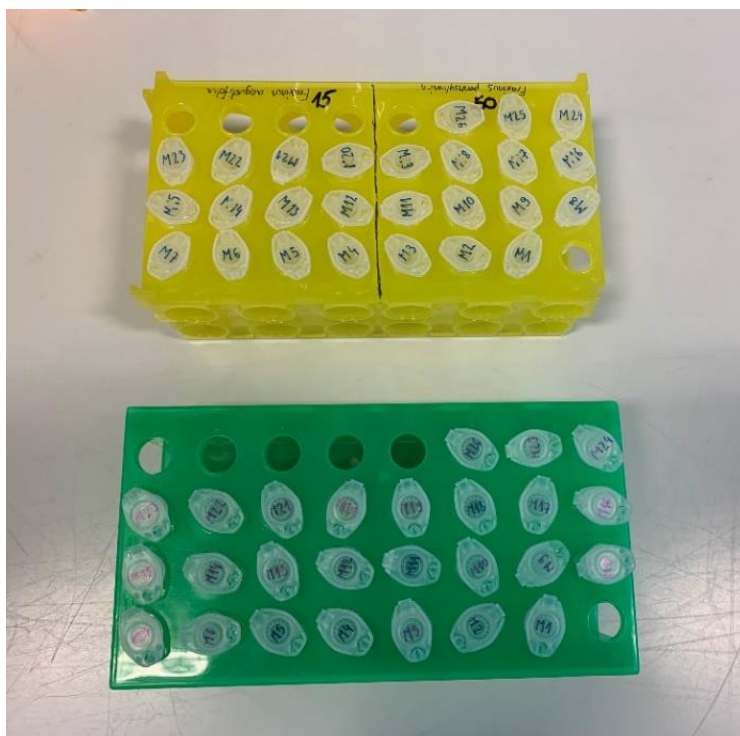
Izolacija DNK je odrađena 27. 5. 2021. godine u Molekularno-biološkom laboratoriju Zavoda za šumarsku genetiku, dendrologiju i botaniku na Fakultetu šumarstva i drvne tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Za izolaciju DNK su korišteni miceliji uzgajani devet dana u ME (Malt Extract) tekućoj hranjivoj podlozi u mikroeprijetama od 2 ml. Miceliji koji su se držali za stijenku epruvete su odvojeni sterilnim nastavkom pipete. Epruvete su centrifugirane 4 min na 17 000 rpm (okretaja u minuti), na 20 °C, nakon čega je pipetom uklonjena tekuća hranjiva podloga. U svaku epruvetu je dodano 300 µl pufera za lizu (20 mM Tris, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10 % SDS, pH 8,0) i jedna sterilna čelična kuglica.

Miceliji su podvrgnuti homogenizaciji, odnosno epruvete sa micelijima izložene trešnji od 30 Hz u trajanju od 3 min u homogenizatoru, uređaju TissueLyser II (Slika 11).

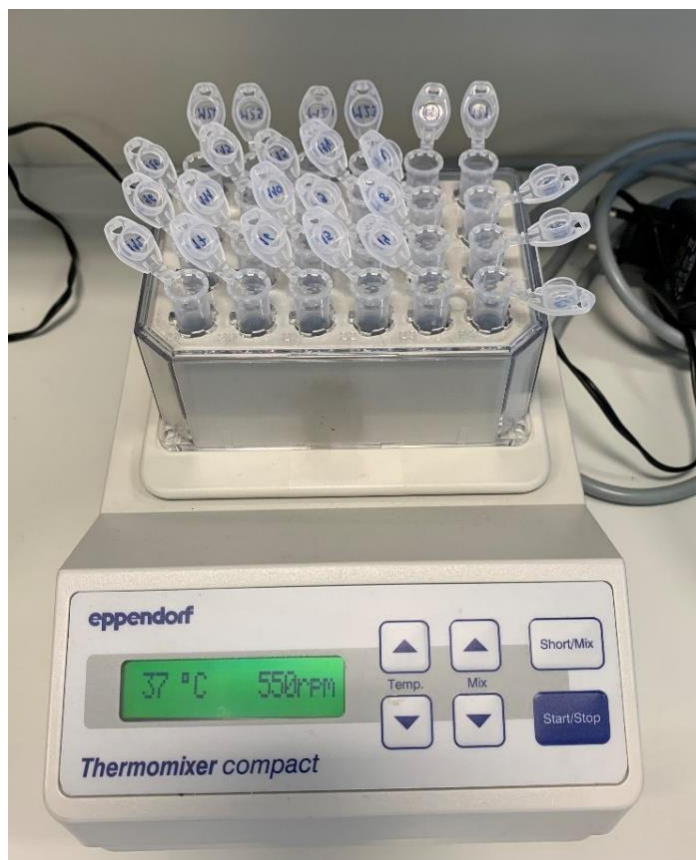


Slika 11. Uređaj Tissue Lyser za homogenizaciju micelija u epruvetama

Zatim je u epruvete dodan natrijev acetat (3 M NaAc, pH 5,2) te su inkubirane na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ u trajanju od 10 min. Epruvete su nakon toga centrifugirane na 13 000 rpm 5 minuta. Nakon centrifugiranja, nastali supernatant (vodena otopina DNK) je ispipetiran u nove epruvete (Slika 12) u koje je potom dodan jednak volumen izopropanola (250 μl). Epruvete su inkubirane 5 min na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (u hladnjaku) te potom podvrgnute centrifugiranju na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ i na 15 000 rpm u trajanju od 20 minuta. Izopropanol je pažljivo odličen iz epruveta u koje je dodan ledeno-hladni apsolutni etanol (500 μl). Epruvete su ponovno podvrgnute centrifugiranju, na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ i na 20 000 rpm u trajanju od 3 min. Nakon toga je etanol ispipetiran iz epruveta koje su stavljene u termoblok na $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ u trajanju od 5 do 10 min kako bi se DNK osušila (Slika 13). Na kraju je u epruvete dodano po 50 μl TE pufera (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) kako bi se DNK u njemu otopila i sačuvala. Otopljena DNK je u epruvetama pohranjena u hladnjak na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Slika 12. Mikroepruvete sa uzorcima DNK



Slika 13. Postupak sušenja DNK u termobloku

3.5. PCR i elektroforeza

U lančanoj reakciji polimerazom (PCR) je umnažana ITS regija izolirane DNK korištenjem početnica ITS1-F i ITS4 (10-15 pb). Uz početnice su u smjesu dodani sastojci: enzim Taq polimeraza, PCR pufer (pH 8.0), nukleotidi (dNTP), magnezijev klorid kao kofaktor i sterilna voda (Tablica 3). U svaku jažicu napravljenu u agaroznom gelu dodano je 1 μ l PCR produkta, a uvjeti reakcije su uniformni i unaprijed definirani (Tablica 4, Slika 14).

Tablica 3. Vrijednosti volumena pojedinih sastojaka smjese za PCR

Sastojak	Volumen za 26 reakcija (μl)
Taq	8.4
ITS1-F	36.4
ITS4	36.4
dNTP	36.4
MgCl ₂	200.2
PCR pufer	182
H ₂ O	1219.4
DMSO	72.8

Tablica 4. Uvjeti lančane reakcije polimerazom (PCR)

Početna	35 ciklusa			Završno
	Denaturacija	Nalijeganje	Produljivanje	
5 min na 95 °C	30 s na 95 °C	30 s na 55 °C	30 s na 72 °C	7 min na 72 °C

Specifičnost, duljina i približna koncentracija dobivenih PCR produkata su provjereni elektroforezom u 1,5 % agaroznom gelu pri naponu od 55 V i trajanju 90 minuta. U gel je prethodno dodana boja za vizualizaciju nukleinskih kiselina. Nakon završene elektroforeze su PCR produkti vizualizirani na gelu i fotografirani pomoću UV transiluminatora s kamerom i računalnog programa GelCapture.



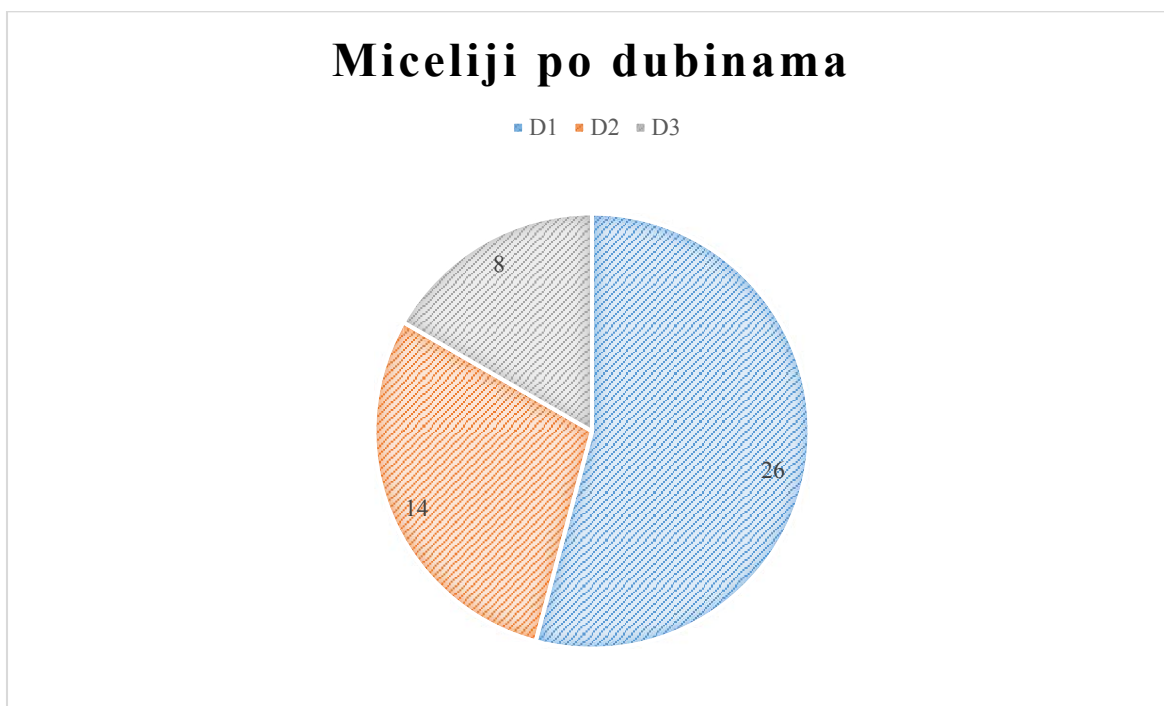
Slika 14. Uređaj za PCR sa ukupno 27 uzoraka: 26 uzoraka DNK i jednim kontrolnim

Dobiveni PCR produkti su slani u tvrtku MacroGen (Nizozemska) na sekvenciranje. Nakon sekvenciranja su u računalnom programu BioEdit obrađeni dobiveni kromatogrami. Zatim su provjerene i uspoređene dobivene sekvence s postojećima iz baze gena (NCBI GenBank) primjenom algoritma BLAST. Za identifikaciju gljive potrebna je podudarnost sekvence od najmanje 98 %, poželjno je 99 - 100 %, na najmanje 80 % duljine sekvence.

4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

U postupku izolacije micelija iz hodnika jelinog valjkastog srčikara pripravljene su 33 Petrijeve zdjelice sa ukupno 60 komadića tkiva hodnika i 60 briseva njihove unutrašnjosti, dva komadića tkiva s kraja hodnika te jednog uzorka valjkastog bijelog micelija koji se nalazio na ulazu u hodnični sustav. Od ukupno 33 Petrijeve, u 18 se nalazila hranjiva podloga MEA obogaćena streptomycinom (plavo obilježene), a u 15 MEA obogaćena streptomycinom i cikloheksimidom (crveno obilježene).

U komori za rast uzgojeno je ukupno 48 micelija iz triju različitih dubina hodnika (D1 – D3). Na dubini D1 je izraslo 26 micelija, na dubini D2 njih 14, a na dubini D3 ukupno 8 micelija (Grafikon 1).



Grafikon 1. Broj izoliranih micelija prema dubini položaja hodnika promatrano od srži prema kori jelinog debla

Presadivanjem micelija u čiste kulture je dobiveno ukupno 48 izolata, 45 iz većih i 3 iz manjih Petrijevih zdjelica. Grupiranjem čistih kultura u morfotipove je dobiveno ukupno 26 morfotipova označenih simbolom M i brojem od 1 do 26.

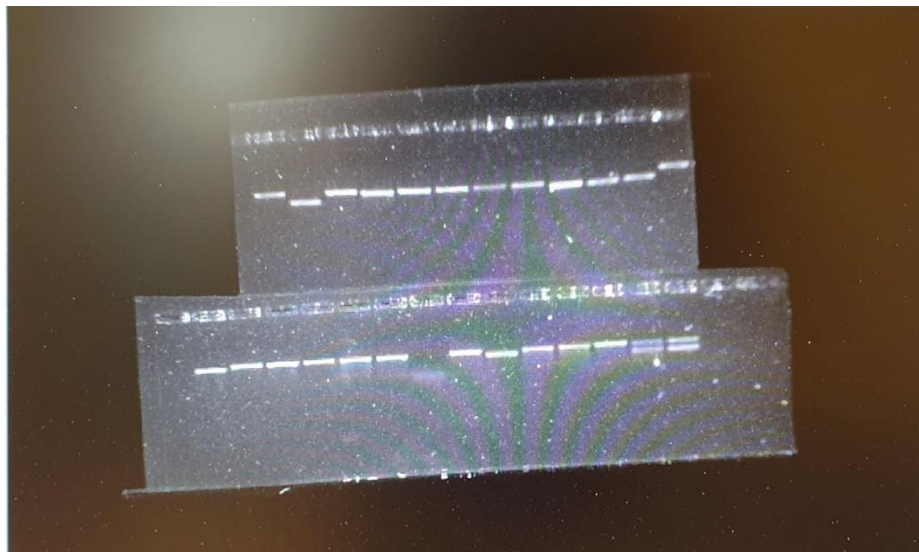
Najviše micelija/izolata je pripalo morfotipu 1, njih sedam. Morfotip 2 je obuhvatio pet izolata, dok su morfotipovi 3 i 4 bili zastupljeni sa po tri izolata. Zatim, morfotipovima od 5 do 12 je pridruženo po dva izolata, a morfotipovima M13 do M26 po jedan (Tablica 5). Od ukupno 26 različitih morfotipova, 23 izolata uzeta za molekularne analize su bila uzgajana na MEA hranjivoj podlozi obogaćenju streptomycinom, a tri izolata (M2 – J2D1H9, M3 – J2D1H1 i M12 – J2D1H6) na MEA podlozi obogaćenju streptomycinom i cikloheksimidom.

Tablica 5. Uzorci micelija obuhvaćeni pojedinim morfotipom

Morfotip	Uzorci micelija						
M1	J2D1H3	J2D1H5	J2D1H8	J2D1H8	J2D2H1	J2D3H3	J2D3H3
M2	J2D1H2	J2D1H9	J2D1H9	J2D1H9	J2D1H9		
M3	J2D1H1	J2D1H1	J2D1H1				
M4	J2D1H6	J2D1H6	J2D1H7				
M5	J2D2H1	J2D2H1					
M6	J2D3H1	J2D3H3					
M7	J2D1H2	J2D1H5					
M8	J2D2H4	J2D2H4					
M9	J2D1H7	J2D2H4					
M10	J2D2H3	J2D2H4					
M11	J2D1H3	J2D3H2					
M12	J2D1H6	J2D1H6					
M13	J2D1'KH'						
M14	J2D1H9						
M15	J2D3H2						
M16	J2D3H1						
M17	J2D1H7						
M18	J2D2H4						
M19	J2D2H3						
M20	J2D1H5						
M21	J2D2H1						
M22	J2D1H6						
M23	J2D2H2						
M24	J2D3H2						
M25	J2D2H2						
M26	J2D2H3						

J - jela; D - dubina; H - hodnik; KH - kraj hodnika

DNK je uspješno izolirana iz svih 26 morfotipova, a lančana reakcija polimerazom je uspjela za njih 25. PCR morfotipa 19 nije uspio – ostao je prazan. Također, kod morfotipova 25 i 26 su umnožene dvije regije DNK (Slika 15).



Slika 15. Elektroforetska analiza PCR produkata na agaroznom gelu (foto: Kranjec Orlović)

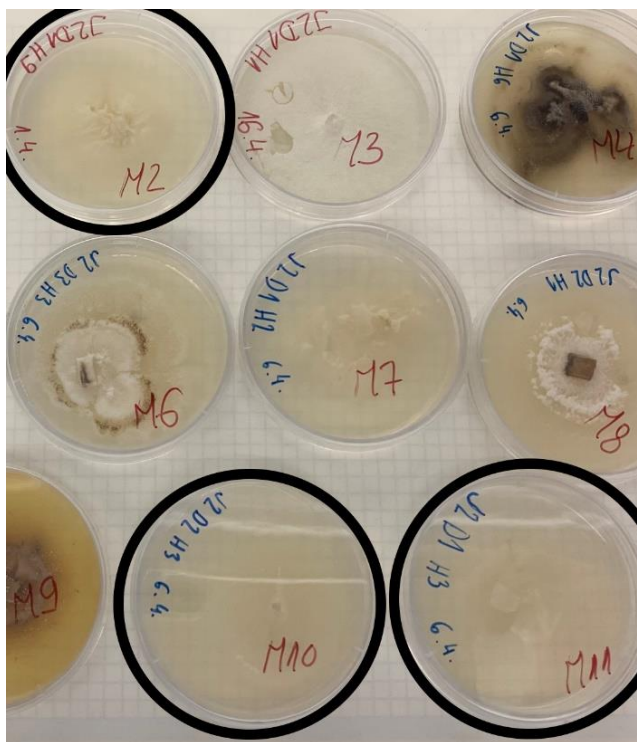
4.1. Zajednica gljiva u hodničnom sustavu potkornjaka *T. oxyurus*

Od ukupno 25 PCR produkata koji su poslani na sekvenciranje, njih 12 je uspješno obrađeno i identificirano s podudarnošću sekvence od 96,01 do 100 % (Tablica 6).

Tablica 6. Popis dobivenih vrsta gljiva

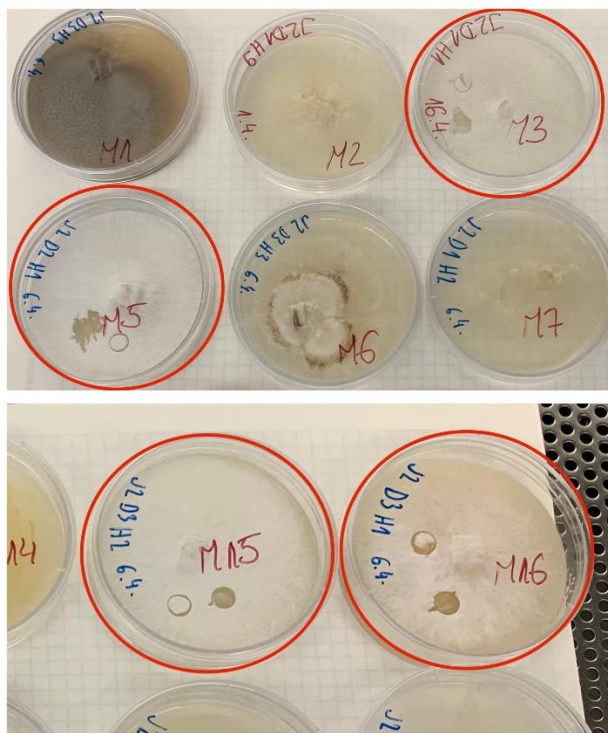
Oznaka uzorka	Počelnica korištena za sekvenciranje	Duljina dobivene sekvence	Najsrodnija vrsta prema BLAST algoritmu	Pristupni broj sekvence najveće podudarnosti	Pokrivenost sekvence (%)	Podudarnost sekvence (%)
2	ITS1-F	419	<i>Candida</i> sp.	FJ873583.1	80	98,82
3	ITS1-F	162	<i>Fomitopsis pinicola</i>	MH855987.1	82	99,25
4	ITS1-F	631	<i>Graphilbum fragrans</i>	MH283082.1	95	99,83
5	ITS1-F	682	<i>Fomitopsis pinicola</i>	MH931272.1	95	99,85
9	ITS1-F	636	<i>Graphilbum fragrans</i>	MH283082.1	94	99,83
10	ITS1-F	406	<i>Candida</i> sp.	FJ873583.1	80	99,39
11	ITS1-F	408	<i>Candida</i> sp.	FJ873583.1	80	99,39
13	ITS1-F	589	<i>Sugiyamaella chiloensis</i>	KY105565.1	94	100
14	ITS1-F	691	<i>Mortierella</i> sp.	MN905914.1	93	96,01
15	ITS1-F	100	<i>Fomitopsis pinicola</i>	MH855987.1	71	100
16	ITS1-F	132	<i>Fomitopsis pinicola</i>	MH086782.1	78	98,08
26	ITS1-F	302	<i>Candida</i> sp.	FJ873583.1	90	100

Četiri morfotipa (od 26) su povezana sa taksonom *Candida* sp. kao najrodnijim prema BLAST algoritmu sa podudarnošću sekvence od 98,82 do 100 %. Radilo se o morfotipovima broj 2 (oznake: J2 D1 H9), broj 10 (J2 D2 H3), broj 11 (J2 D1 H3) i broj 26 (J2 D2 H3) (Slika 16).



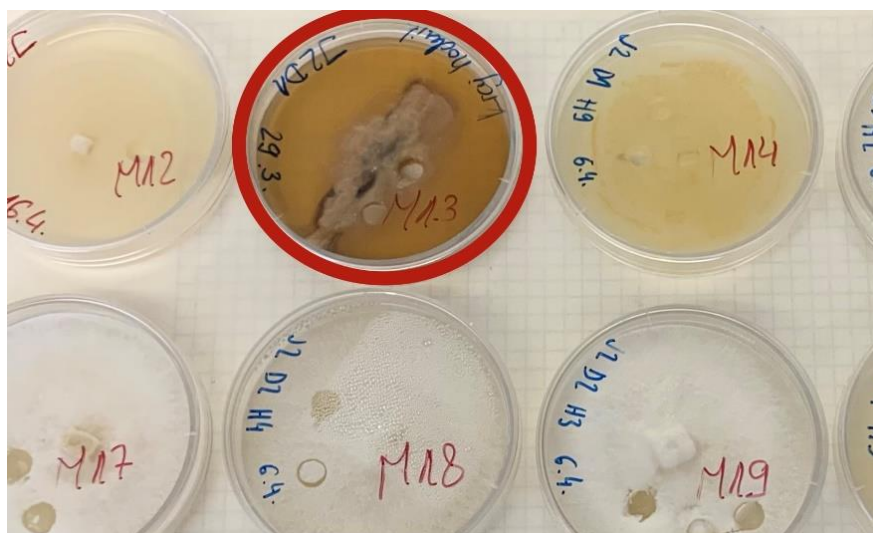
Slika 16. Kulture gljive *Candida* sp. (označeno crnim obrubom)

Četiri morfotipa (M3, M5, M15 i M16) su identificirana kao vrsta *Fomitopsis pinicola* sa podudarnošću sekvence od najmanje 98,08 % dok se pokrivenost sekvence kretala od 71 do 95 % (Slika 17).



Slika 17. Čiste kulture morfotipova identificiranih kao *Fomitopsis pinicola*

Morfotip 13 je prema BLAST algoritmu pokazao 100 %-tnu podudarnost sa vrstom *Sugiyamaella chiloensis* uz pokrivenost sekvence 94 % (Slika 18). Morfotip 13 je uzorkovan s kraja hodnika na dubini D1.



Slika 18. Čista kultura *Sugiyamaella chiloensis* (obilježeno crvenim obrubom)

Obradom kromatograma sekvenci pojedinih morfortipova i provjerom u NCBI banci gena pretpostavljene su najsirodnije vrste prema BLAST algoritmu, ali zbog niske podudarnosti i pokrivenosti sekvenci nisu pouzdano utvrđene (Tablica 7).

Tablica 7. Morfortipovi i pretpostavljene najsirodnije vrste niskih podudarnosti i pokrivenosti sekvenci

Oznaka morfortipa	Počelnica korištena za sekvenciranje	Najsirodnija vrsta prema BLAST algoritmu	Pristupni broj sekvence najveće podudarnosti	Pokrivenost sekvence (%)	Podudarnost sekvence (%)
1	ITS1-F	<i>Acrodontium simplex</i>	MH857128.1	95	86,64
6	ITS1-F	<i>Ophiostoma ainoae</i>	MH144076.1	93	77,78
7	ITS1-F	<i>Ophiostoma canum</i>	GQ423532.1	83	81,48
8	ITS1-F	<i>Sporothrix inflata</i>	MT360679.1	81	84,12
12	ITS1-F	<i>Ophiostoma piceae</i>	MH740937.1	95	89,92
20	ITS1-F	<i>Sporothrix/Ophiostoma</i>	LC228657.1 / NR_158859.1	67/15	75.28/93.14
21	ITS1-F	<i>Trigonopsis vinaria</i>	NR_154535.	92	83,76

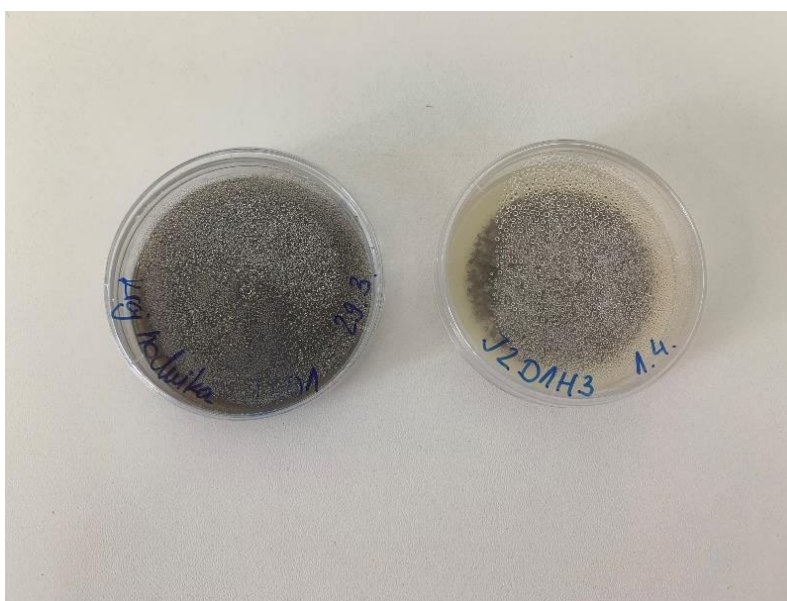
PCR produkti pojedinih morfortipova nisu uspješno sekvencirani, odnosno dobiveni kromatogrami sekvenci nisu bili pouzdani, stoga srodne vrste određene prema BLAST algoritmu nisu prihvaćene kao točne (Tablica 8).

Tablica 8. Popis morfortipova čiji PCR produkti nisu uspješno sekvencirani

Oznaka morfortipa	Najsirodnija vrsta prema BLAST algoritmu	Pristupni broj sekvence najveće podudarnosti	Pokrivenost sekvence (%)	Podudarnost sekvence (%)
6	<i>Ophiostoma ainoae</i>	MH144076.1	93	77,78
7	<i>Ophiostoma canum</i>	GQ423532.1	83	81,48
8	<i>Sporothrix inflata</i>	MT360679.1	81	84,12
12	<i>Ophiostoma piceae</i>	MH740937.1	95	89,92
20	<i>Sporothrix/Ophiostoma</i>	LC228657.1 / NR_158859.1	67/15	75.28/93.14

Od ukupnog broja morfotipova njih 13 nije uspješno identificirano zbog malog postotka podudarnosti i pokrivenosti sekvence ili zbog neuspješnog sekvenciranja. Shodno tome, uspješnost identifikacije gljiva je iznosila svega 48 %.

Iz uzoraka hodnika su također izolirani miceliji gljiva koje se kategoriziraju kao plijesni i najčešće predstavljaju kontaminaciju. Čiste kulture su presađene iz uzoraka hodnika J2 D1 H3 i J2 D1 H9 (Slika 19), a do razvoja plijesni je došlo u ukupno sedam Petrijevih zdjelica. Plijesan je uočena i na jednom od uzoraka uzetih sa kraja hodnika. U ovom istraživanju plijesni nisu podvrgnute postupku identifikacije molekularnim metodama.



Slika 19. Čiste kulture plijesni dobivenih iz uzoraka hodnika

5. RASPRAVA

Treptoplatypus oxyurus smatra se rijetkom vrstom vrlo disjunktnog areala. Poznat je tek na nekoliko lokacija u Europi. U Hrvatskoj je otkriven 2010. godine na rubu i neposrednoj okolini Nacionalnog parka Sjeverni Velebit. U susjednim zemljama Hrvatske nije otkriven, a ni u većini zemalja Europe u kojoj se obična jela javlja u šumskim zajednicama. Ta činjenica je neobična jer je realno za pretpostaviti, da je površina sličnog flornog sastava, šumskih zajednica i stanišnih uvjeta daleko veća od one na kojoj je danas poznat pridolazak ove slabo poznate vrste.

Unatoč činjenici da neke europske zemlje imaju velike površine prirodnih jelovo i bukovo-jelovih šuma, *T. oxyurus* do danas u većini nije pronađen. Pretpostavlja se da klimatski i stanišni uvjeti utječu na pojavu i učestalost jelinog valjkastog srčikara, ali i cijele potporodice Platypodinae. Uglavnom većina pripadnika potporodice obitava u tropskoj i suptropskoj klimi palearktičkog područja. *T. oxyurus* je obligatni ksilomicetofag zbog čega je njegova rasprostranjenost vezana za područja obitavanja simbiotskih gljiva. Jedna od mogućnosti njegova limitiranog područja pridolaska je eventualna povezanost s mikološkim kompleksom, odnosno mogućnost da su simbiotske gljive jedan od uzroka uske rasprostranjenosti kukca.

U Hrvatskoj su danas poznate dvije autohtone palearktičke vrste *T. oxyurus* i *P. cylindrus*. U morfološkom, ali i biološkom smislu imaju mnogo sličnosti. Jelin i hrastov valjkasti srčikar su obligatni ksilomicetofagi sa razvijenim micetangijima koje koriste za transport simbiotskih gljiva. Oba srčikara izgrizaju hodnike u drvu biljke domaćina i liježu jaja iz kojih se razvijaju micetofagne ličinke. Unutar hodničnih sustava *P. cylindrus* uočeno je kompleksno socijalno ponašanje i ustrojstvo. Tijekom razvojnog ciklusa mužjak pomaže ženki čistiti piljevinu iz hodnika i pruža zaštitu od ulaska predatora i parazitoida (Jordal, 2014). Pretpostavlja se da je razvojni ciklus jelinog valjkastog srčikara sličan. Prilagodбом kukaca, razvojem mikangija je gljivama pružena zaštita od vanjskih opasnosti i omogućen transport do domaćina.

5.1. Identificirane vrste gljiva

U hodničnom sustavu potkornjaka *T. oxyurus*, uzorkovanjem i analizom DNK je utvrđena najveća prisutnost gljiva iz roda *Candida*. Njihova identifikacija je uspjela samo do razine roda jer se radi o kvascima kod kojih je teško utvrditi vrstu samo na temelju ITS regije DNK, radi visoke sličnosti i podudarnosti tog dijela sekvence između različitih vrsta. Za utvrđivanje vrste bi u daljnjim istraživanjima trebalo ispitati i druge regije DNK i podvrgnuti ih filogenetskoj obradi. Vrste iz roda *Candida* česte su u hodničnim sustavima, crijevima i egzoskeletu potkornjaka. Smatra se da ishrana i stanište kukca najviše utječu na učestalost kvasaca. Kemijske tvari koje proizvode kvasci imaju biokativnu ulogu kod člankonošaca. Male koncentracije kvasaca privlače potkornjake, a velike odbijaju (Davis, 2014). Brojna istraživanja potvrđuju identifikaciju različitih vrsta *Candida* u hodnicima različitih vrsta kornjaša, poput: *Ips* spp., *Dendroctonus* spp., *Platypus* spp. (Leufven i sur., 1984; Hernandez-Martinez i sur., 2016). Kvasci odjela *Ascomycota*, kod kojih spolni ciklus nije poznat, se obično ne mogu identificirati na razini vrste. Teško je utvrditi vrstu kvasca, a malo se pažnje posvećuje potencijalnom polimorfizmu u sekvencama DNK. Smatra se da je analiza višestrukih, samostalnih izolata posebno važna kada se radi o nespolnim formama. Poznate i do sad istraživane vrste *Candida* su: *Candida apicola*, *C. parazyma*, *C. azymoides*, *C. azyma*, *C. drosophilae*, *C. vanderwaltii* (Lachance i sur., 2009).

Zanimljiva je identifikacija (morfotip broj četiri) vrste srodne kvascima – *Sugiyamaella chiloensis*. *Sugiyamaella* spp. pripadaju redu *Saccharomycetales* i porodici *Trichomonascaceae*. Pripadnici roda izolirani su direktno iz zaraženog drva u asocijaciji s kukcima ili iz uobičajenih staništa kukaca. Pridolaze na trulom i mrtvom drvu. Većina vrsta je prijavljena kao potencijalni proizvođači enzima ksilanaze. *S. chiloensis* uglavnom ne proizvodi askospore. Četiri ispitana soja *S. chiloensis* opisana su kao anamorfni stadij *Candida* spp. i varijetet *chiloensis* (Kurtzman, 2007; Shi, 2021).

Mortierella sp. su gljive koje obitavaju u tlu (saprotrofi), a ovome rodu po provedenoj identifikaciji pripada morfotip 14. Saprotrofi su organizmi koji se hrane mrtvim organskim tvarima i razgrađuju ih pomoću enzima. Neobično, ali zanimljivo je prisustvo ovog roda u hodničnom sustavu vrste *T. oxyurus*. Četiri morfotipa su identificirana kao još jedan saprotrof, *Fomitopsis pinicola* ili crvenorubna guba, koja u drvu uzrokuje smeđu trulež i parazit je rana. Crvenorubna guba je uglavnom sekundarni štetnik koji napada oslabljena stabla.

Jedan od morfotipova je identificiran kao vrsta *Graphilbum fragrans* koja pripada redu *Ophiostomatales* i odjelu *Ascomycota*, kojem pripadaju i kvasci. Svi primjerci vrsta *Graphilbum* su pronađeni u hodnicima potkornjaka u drvu četinjača. Međusobno su slične morfologije i većinom aseksualni. Pretpostavlja se da obitavaju u simbiozi s kukcima (Jankowiak i sur., 2020).

Prema istraživanju koje su proveli Henriques i sur. (2006), *P. cylindrus* je povezan sa nešto drugačijom zajednicom gljiva u odnosu na vrstu *T. oxyurus*. U hodničnom sustavu vrste *P. cylindrus* značajne su ambrozija gljive *Raffaelea* spp., koje u hodniku vrste *T. oxyurus* nisu utvrđene. Značajni su i rodovi *Aspergillus* i *Fusarium* u galerijama *P. cylindrus*. Uočena je prisutnost plijesni u oba hodnična sustava. U hodnicima vrste *P. cylindrus* radi se o *Penicillium* spp. *Penicillium* spp. je vrlo poznata i široko rasprostranjena skupina gljiva koju pronalazimo na različitim staništima od tla, vegetacije, zraka do prehrambenih proizvoda. Glavna funkcija ove skupine gljiva u prirodi je razgradnja organske materije na način da vrste različitim mikotoksinima uzrokuju trulež i raspadanje. Iako je rod *Penicillium* vrlo čest i taksonomski dobro definiran, problem predstavlja identifikacija vrsta zbog zastarjelog popisa prihvaćenih vrsta i nepotpunih genskih banaka. Značajnije vrste su: *P. candidum*, *P. glaucum*, *P. expansum*. Identifikacija vrsta ukazuje na sličnosti rodova *Penicillium* i *Aspergillus*. Pojedine vrste iz roda *Penicillium* imaju konidiofore identične vrstama roda *Aspergillus*, npr. *Penicillium paradoxum* (Visagie i sur., 2014). Također, unutar plijesni ističe se i rod *Aspergillus* čiji pripadnici uzrokuju trulež drva i raspadanje drvene tvari. Najznačajnija vrsta je *Aspergillus niger* - nitasta askomicetna gljiva (Hamed, 2013).

5.2. Slaba uspješnost identifikacije taksona gljiva

Uspješnost identifikacije 26 morfotipova na temelju ITS regije DNK je u ovom istraživanju iznosila svega 48 %. Postoji mogućnost da su u lančanoj reakciji polimerazom početnice nalijegale na nekoliko različitih sekvenci, odnosno da nisu bile dovoljno specifične za istraživane vrste gljiva ili je temperatura nalijeganja bila preniska, što je moglo dovesti do umnažanja više regija DNK (iako navedeno nije bilo vidljivo na agaroznom gelu, osim kod morfotipova 25 i 26), što u konačnici rezultira dobivanjem nečitljivih kromatograma u postupku sekvenciranja.

Osim toga, izgledno je da ITS regija nije dovoljno specifična za identifikaciju vrsta gljiva vezanih uz potkornjake i bolji rezultati bi zasigurno bili dobiveni korištenjem dodatnih regija DNK, kao što su LSU (*ribosomal large subunit*), TUB (*partial beta-tubulin*) ili TEF (*translation elongation factor*) (Nel i sur., 2021). Slaba uspješnost identifikacije može biti i posljedica pronalaženja novih taksona gljiva koji još dosad nisu opisani, odnosno njihove sekvence nisu unijete u GenBank bazu gena koja je u ovome istraživanju korištena kao referentna baza za usporedbu.

6. ZAKLJUČAK

Jelin valjkasti srčikar (*Treptoplastypus oxyurus*) je jedan od dvije palearktičke vrste srčikara koji obitavaju u Hrvatskoj. U susjednim zemljama, ali i u većini zemalja Europe u kojima pridolazi njegov glavni domaćin, obična jela, nije identificiran. Ta činjenica je neobična jer zemlje Europe imaju sličan florni sastav i velike površine, barem donekle prirodnih zajednica u kojima pridolazi obična jela. Pretpostavlja se da klimatski i stanišni uvjeti utječu na njegovu rasprostranjenost, ali i postojanje i dostupnost simbiotskih gljiva. Biologija kukca je nedovoljno istražena u Hrvatskoj, ali i u malom broju zemalja u kojima je poznat pa stoga je važno nastaviti istraživati biologiju i moguće razloge njegovog ograničenog pridolaska. S obzirom na simbiozu *T. oxyurus* i gljiva napravljena je mikrobiološka obrada 26 uzoraka drva. Izolacijom DNK i lančanom reakcijom polimeraze je utvrđena potencijalna zajednica gljiva u hodničnom sustavu *T. oxyurus*. Identificirano je 12 micelija na bazi roda i vrste s 48 % uspješnosti. U dobivenoj zajednici gljiva ističu se: kvasci (*Candida* sp.) i vrste srodne kvascima (*Sugiyamaella chiloensis*), *Fomitopsis pinicola* u četiri uzorka, te plijesni (*Penicillium* i *Aspergillus*). Slaba uspješnost identifikacije ukazuje na nedovoljnu specifičnost ITS regije, ali i posljedica je pronalaženja potencijalno novih neopisanih taksona gljiva čije sekvence još uvijek nisu unešene u GenBank bazu gena.

7. LITERATURA

- Batra, L. R., 1985: *Ambrosia* beetle and their associated fungi: Research trends and techniques. Proc Indian Acad Sci Plant Sci, 1985; 49: 137-148
- Beaver, R. A., 1998: New synonymy, new combinations and taxonomic notes on Scolytidae and Platypodidae (Insecta: Coleoptera). Ann. Naturhist. Mus. Wien., 100B, 179-192, Wien, Dezember 1998. <https://www.biologiezentrum.at>
- Biedermann, P. H. W., Vega, F. E., 2020: Ecology and Evolution of Insect-Fungus Mutualisms. Annual Review of Entomology
- Cassier, P., Levieux, J., Morelet, M., Rougon, D., 1995: The Mycangia of *Platypus cylindrus* Fab. and *Platypus oxyurus* Dufour (Coleoptera: Platypodidae). Structure and Associated Fungi
- Davis, T. S., 2014: The Ecology of Yeasts in the Bark Beetle Holobiont: A century of Research Revisited. <https://www.link.springer.com>
- Dohet, L., Gregoire, J. – C., Berasategui, A., Kaltenpoth, M., Biedermann, P. H. W., 2016: Bacterial and fungal symbionts of parasitic *Dendroctonus* bark beetles. FEMS Microbiology Ecology, 92, 2016, fiw129
- Hamed, S. A. M., 2013: In-vitro studies on wood degradation in soil by soft-rot fungi: *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysogenum*. <https://www.doi.org>
- Henriques, J., Inacio, M. de L., Sousa, E., 2006: *Ambrosia* fungi in the insect-fungi symbiosis in relation to cork oak decline. Rev Iberoam Micol 2006; 23: 185-188, Portugal
- Hernandez-Martinez, F., Briones-Roblero, C. I., Nelson, D. R., Rivera-Orduna, F. N., Zuniga, G., 2016: Cytochrome P450 complement (CYPome) of *Candida oregonensis*, a gut-associated yeast of bark beetle, *Dendroctonus rhizophagus*. <https://www.doi.org>
- Hrašovec, B., 2011: Jelin valjkasti srčikar – *Platypus oxyurus*. Šumarski list, 9-10/2011, 124 str. <https://www.sumari.hr/sumlist>
- Hrašovec, B., Franjević, M., 2011a: Biology and ecology of newly found species *Platypus oxyurus* Dufour, 1843 (*Treptoplatypus oxyurus* Dufour, 1843) in North Velebit, Croatia. Faculty of forestry, University of Zagreb, Svetošimunska 25, 10 002 Zagreb, Croatia
- Hrašovec, B., Franjević, M., 2011b: Primjenjena entomologija. Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za zaštitu šuma i lovno gospodarstvo, Zagreb, lipanj 2011, 83-84 str.

- Jankowiak, R., Solheim, H., Bilanski, P., Marincowitz, S., Wingfield, M. J., 2020: Seven new species of *Graphilbum* from conifers in Norway, Poland, and Russia. <https://doi.org>
- Jordal, B. H., 2014: Arthropoda: Insecta: Coleoptera: Volume 3: Morphology and Systematics (Phytophaga). <https://www.researchgate.net>
- Jordal, B. H., 2015: Molecular phylogeny and biogeography of the weevil subfamily Platypodinae reveals evolutionarily conserved range patterns. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, Volume 92, November 2015, pp. 294-307
- Joseph, R., Keyhani, N. O., 2021: Fungal mutualisms and pathosystems: life and death in the ambrosia beetle mycangia. <https://www.doi.org>
- Kurtzman, C. P., 2007: Eleven new species of *Sugiyamaella* and *Candida* from forest habitats. <https://www.academic.oup.com>
- Lachance, M. – A., Dobson, J., Wijayanayaka, D. N., Smith, A. M. E., 2009: The use of parsimony network analysis for the formal delineation of phylogenetic species of yeasts: *Candida apicola*, *Candida azyma* and *Candida parazyza* sp. nov., cosmopolitan yeasts associated with floricolous insects. *Antonie van Leeuwenhoek* (2010), 97: 155-170
- Leufven, A., Bergstrom, G., Falser, E., 1984: Interconversion of verbenols and verbenone by identified yeasts isolated from spruce bark beetle *Ips typhographus*. <https://www.link.springer.com>
- Nel, W. J., Wingfield, M. J., Beer, Z. W., Duong, T. A., 2021: Ophiostomatalean fungi associated with wood boring beetles in South Africa including two new species.. <https://www.doi.org>
- Shi, C.-F., Zhang, K.-H., Chai, C.-Y., Yan, Z.-L., Hui, F.-L., 2021: Diversity of the genus *Sugiyamaella* and description of two new species from rotting wood in China. <https://www.mycokokeys.com>
- Visague, C. M., Houbraeken, J., Frisvad, J. C., Hong, S. – B., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., Seifert, K. A., Varga, J., Yaguchi, T., Samson, R. A., 2014: Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. <https://www.studiesinmycology.org>