

Molekularna identifikacija gljiva u hodničnom sustavu jelinog valjkastog srčikara, *Treptoplatypus oxyurus* (Dufour, 1843.)

Meštrović, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:108:349520>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-06**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET ŠUMARSTVA I DRVNE TEHNOLOGIJE
ŠUMARSKI ODSJEK

SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ
UZGAJANJE I UREĐIVANJE ŠUMA S LOVNIM GOSPODARENJEM

KATARINA MEŠTROVIĆ

MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA GLJIVA U HODNIČNOM
SUSTAVU JELINOŠ VALJKASTOG SRČIKARA, *Treptoplatypus oxyurus*
(Dufour, 1843.)

DIPLOMSKI RAD

ZAGREB, 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET ŠUMARSTVA I DRVNE TEHNOLOGIJE
ŠUMARSKI ODSJEK

SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ
UZGAJANJE I UREĐIVANJE ŠUMA S LOVNIM GOSPODARENJEM

KATARINA MEŠTROVIĆ

MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA GLJIVA U HODNIČNOM
SUSTAVU JELINOŠ VALJKASTOG SRČIKARA, *Treptoplatypus oxyurus*
(Dufour, 1843.)

DIPLOMSKI RAD

ZAGREB, 2023.

FAKULTET ŠUMARSTVA I DRVNE TEHNOLOGIJE
ŠUMARSKI ODSJEK

**MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA GLJIVA U HODNIČNOM
SUSTAVU JELINOŠ VALJKASTOG SRČIKARA, *Treptoplatypus oxyurus*
(Dufour, 1843.)**

DIPLOMSKI RAD

Diplomski studij: Uzgajanje i uređivanje šuma s lovnim gospodarenjem

Predmet: Integrirana zaštita šuma (ŠDU4001)

Ispitno povjerenstvo:

1. Doc. dr. sc. Jelena Kranjec Orlović
2. Prof. dr. sc. Boris Hrašovec
3. Prof. dr. sc. Danko Diminić

Studentica: Katarina Meštrović

JMBAG: 0068228762

Datum odobrenja teme: 5.5.2023.

Datum predaje rada: 4.9.2023.

Datum obrane rada: 27.9.2023.

Zagreb, rujan 2023.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Naslov	Molekularna identifikacija gljiva u hodničnom sustavu jelinog valjkastog srčikara, <i>Treptoplatypus oxyurus</i> (Dufour, 1843.)
Title	Molecular identification of fungi in the galleries of the fir pinhole borer, <i>Treptoplatypus oxyurus</i> (Dufour, 1843.)
Autor	Katarina Meštrović
Adresa autora	Zorkovačka ulica 2, 10000 Zagreb
Mjesto izrade	Sveučilište u Zagrebu, Fakultet šumarstva i drvne tehnologije
Vrsta objave	Diplomski rad
Mentorica	Doc.dr.sc. Jelena Kranjec Orlović
Komentor	-
Godina objave	2023.
Obujam	38 stranica, 8 tablica, 1 grafikon, 19 slika, 47 navoda literature
Ključne riječi	<i>Treptoplatypus oxyurus</i> , ambrozija kukci, simbioza, molekularna identifikacija.
Keywords	<i>Treptoplatypus oxyurus</i> , ambrosia beetles, symbiosis, molecular identification.
Sažetak	Jelin valjkasti srčikar (<i>Treptoplatypus oxyurus</i>) jedan je od dvije vrste srčikara iz potporodice <i>Platypodinae</i> koje obitavaju u Hrvatskoj. Ima disjunktni areal, sekundarni je štetnik jele i živi u simbiozi s gljivama ambrozije. Zbog nedovoljno istražene biologije, cilj ovog rada bio je molekularnom identifikacijom utvrditi zajednicu gljiva simbionta do razine vrste. U rezultatima se ističu kvasci <i>Meyerozyma guilliermondi</i> i <i>Saprochaete fungicola</i> , te crvenorubna guba <i>Fomitopsis pinicola</i> .
Summary	Fir pinhole borer (<i>Treptoplatypus oxyurus</i>) is one of the two wood-boring species from subfamily <i>Platypodinae</i> that are discovered in Croatia. It has disjunct habitat, it is a secondary pest of fir and lives in symbiosis with ambrosia fungi. Due to insufficiently researched biology, the aim of this paper was to determine the fungal symbiont community down to the species level by using molecular identification methods. <i>Meyerozyma guilliermondi</i> and <i>Saprochaete fungicola</i> yeasts stand out in the results, as well as the decay fungus <i>Fomitopsis pinicola</i> .



IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

OB FŠDT 05 07

Revizija: 2

Datum: 29.04.2021.

„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“.

U Zagrebu, 24. rujna, 2023. godine

vlastoručni potpis

Katarina Meštrović

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. <i>Treptoplatypus oxyurus</i> u Hrvatskoj.....	1
1.2. Biološke i morfološke karakteristike jelinog valjkastog srčikara.....	2
1.3. Ambrozija kukci.....	3
1.4. Molekularna identifikacija gljiva.....	6
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	10
3. MATERIJALI I METODE.....	11
3.1. Čiste kulture gljiva korištene za identifikaciju.....	11
3.2. Izolacija DNK iz čistih kultura micelija.....	13
3.3. Analiza dobivenih uzoraka DNK u lančanoj reakciji polimerazom (PCR).....	14
3.4. Provjera PCR produkata elektroforezom.....	17
3.5. Sekvenciranje DNK.....	18
4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA.....	19
5. RASPRAVA.....	23
5.5. Identificirane vrste gljiva.....	23
6. ZAKLJUČAK.....	32
7. LITERATURA.....	34

POPIS SLIKA

Slika 1. Mužjak jelinog valjkastog srčikara (Foto: Saturnin de la Poire, 2014).	1
Slika 2. Mužjak <i>T. oxyurus</i> izbacuje komadiće piljevine iz hodnika (foto: Hrašovec, izvor: Krcivoj, 2021).	2
Slika 3. Mikangij na ženki <i>T. oxyurus</i> (foto: prof.dr.sc. Boris Hrašovec).....	4
Slika 4. Miceliji gljiva u hodnicima (foto: J.D. Hopkins).	5
Slika 5. Sangerovo sekvenciranje (Izvor: Estevezj 2012, prevedeno na hrvatski).	8
Slika 6. Centrifugiranje epruveta.	14
Slika 7. Uređaj za PCR.	15
Slika 8. Pipetiranje PCR Master Mix-a u epruvete.....	15
Slika 9. Nanošenje PCR produkta u jažice gela.....	17
Slika 10. Agarozni gel sa PCR produktima dobivenim umnažanjem LSU regije.	19
Slika 11. Grafički prikaz identificiranih vrsta i pripadajućeg broja uzoraka (izolata, micelija) na temelju LSU regije.	20
Slika 12. Izolat 4.1 – <i>Meyerozyma guilliermondii</i>	24
Slika 13. Izolat 3.8 – <i>Fomitopsis pinicola</i>	25
Slika 14. <i>Fomitopsis pinicola</i> (foto: Justin Long, 2019).....	26
Slika 15. Ličinke <i>G. boleti</i> na sporokarpu gljive <i>F. pinicola</i> (foto: M. Bellifa, 2017).	27
Slika 16. Izolat 3.10 – <i>Graphilbum fragrans</i>	28
Slika 17. Uzorak 04 – <i>Sugiyamaella chiloensis</i>	29
Slika 18. Izolat 023 – <i>Saprochaete fungicola</i>	30
Slika 19. Izolat 3.5 – <i>Penicillium sp.</i>	31

POPIS TABLICA

Tablica 1. Popis korištenih micelija.....	11
Tablica 2. Koncentracije pojedinih sastojaka za PCR smjesu.	16
Tablica 3. Uvjeti PCR reakcije za ITS (Internal Transcribed Spacer) regiju.	16
Tablica 4. Uvjeti PCR reakcije za LSU (Large Ribosomal Subunit) regiju.	16
Tablica 5. Uvjeti PCR reakcije za TUB (Partial Beta-Tubulin) regiju.....	17
Tablica 6. Popis dobivenih vrsta gljiva; LSU regija.	20
Tablica 7. Popis dobivenih vrsta gljiva; ITS regija.....	22
Tablica 8. Popis dobivenih vrsta gljiva; TUB regija.....	22

ZAHVALE

Zahvaljujem svojoj mentorici dr. sc. Jeleni Kranjec Orlović na strpljenju, prenesenom znanju i vodstvu tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Posebno zahvaljujem baki Ljubici i pok. djedu Šimi na podršci pri studiranju, brojnim savjetima, velikoj kolekciji šumarske literature i nasljeđenoj ljubavi prema šumarskoj struci.

Hvala roditeljima Sanji i Ivanu, pok. baki Branki i djedu Milivoju, što su mi omogućili i uvelike olakšali studiranje.

Hvala sestri Franki, bratu Luki, prijateljicama Vesni i Evi na nezaboravnim trenucima koji su mi uljepšali studiranje.

Hvala Miki što je uvijek pažljivo slušala moja ponavljanja za ispite.

Najveće hvala zaručniku Vedranu, mom uzoru i najboljem prijatelju, koji me motivirao i bio sa mnom kroz sve uspone i padove.

1. UVOD

1.1. *Treptoplatypus oxyurus* u Hrvatskoj

Jelin valjkasti srčikar, *Treptoplatypus oxyurus*, iz potporodice *Platypodinae* (srčikari), spada u red *Coleoptera* (kornjaši), i porodicu *Curculionidae* (pipe) (Slika 1). Ova se vrsta pojavljuje u jelovim sastojinama, očuvane prašumske strukture, na stablima obične jele (*Abies alba*) i grčke jele (*A. cephalonica*). Isprekidanog je prostora rasprostranjivanja. Pronađen je na Pirinejima, jugu Italije, otocima Korzici i Sardiniji, te u Grčkoj i Turskoj. U središnjoj Europi je pronadjen samo u Njemačkoj i Slovačkoj, a 2010. godine i u Hrvatskoj. Tijekom monitoringa populacije smrekinih potkornjaka (*Ips typographus* i *Pityogenes chalcographus*) na području nacionalnog parka Sjeverni Velebit, u feromonskoj je klopki slučajno uhvaćen mužjak jelinog valjkastog srčikara. Ubrzo nakon prvog pronalaska, u jesen 2011. godine, na području Šumarije Krasno, u dva oborena jelova trupca otkrivene su gusto naseljene ličinke i spolno zrele jedinke (Hrašovec i Franjević, 2011). Do danas je u Hrvatskoj utvrđena prisutnost na lokacijama Risnjak, Velebit i Plitvička jezera (Krcivoj, 2021).



Slika 1. Mužjak jelinog valjkastog srčikara
(Foto: Saturnin de la Poire, 2014).

U susjednim zemljama Hrvatske i široj okolici (Albanija, Austrija, Bugarska, Češka, Makedonija, Poljska, Rumunjska, Švicarska) nije pronađen, unatoč tome što se u tim zemljama jela prirodno rasprostranjuje. Do nedavno se smatralo da *T. oxyurus* pridolazi isključivo u šumama prašumskog karaktera, zbog manjka pogodnih (fiziološki slabih) stabala jele u gospodarenim sastojinama (Žarković i sur., 2022).

1.2. Biološke i morfološke karakteristike jelinog valjkastog srčikara

Život jelinog valjkastog srčikara uglavnom se, osim u razdoblju rojenja, odvija u galerijskim sustavima unutar debla jele. Ima jednogodišnji razvojni ciklus. Razdoblje rojenja odvija se u ljetnim mjesecima, najčešće tijekom srpnja i kolovoza. *T. oxyurus* je monogamna vrsta. Nakon uspješne kopulacije, *T. oxyurus* se počinje ubušivati u deblo jele. Koloniziraju već fiziološki oslabljena stabla, mrtva i raspadnuta stabla, stabla pod stresom te svježe srušena ili posječena stabla, što ih čini sekundarnim štetnicima. Simptomi zaraze vrstom *T. oxyurus* mogu se prepoznati po bijeloj piljevini na kori jele i okolnom tlu tijekom razdoblja ubušivanja i izgrizanja hodnika. Ženka svojim snažnim mandibulama odgriza komadiće drva i polako formira hodnik, dok mužjak iz njih izbacuje piljevinu (Slika 2). Svaki galerijski sustav ima jedan otvor (Žarković i sur., 2022).



Slika 2. Mužjak *T. oxyurus* izbacuje komadiće piljevine iz hodnika (foto: Hrašovec, izvor: Krcivoj, 2021).

Roditeljski se hodnik proteže od kore prema središtu debla. Ubrzo nakon ulaska srčikara u deblo, dolazi do infekcije drva sporama gljiva i zato su hodnici pretežno crne boje. Te spore unešene su preko tijela kukca, tj. u mikangijama. Ženka nakon ubušivanja polaže jaja u hodnike. Nakon nekog vremena iz jaja izlaze ličinke, koje se zajedno sa adultima, hrane micelijima gljiva. Ličinke također izgrizaju svoje hodnike pomoću već dobro razvijenih mandibula. Kad se ličinke dovoljno razviju za prelazak u fazu kukuljenja, u postranim hodnicima počinju izgrizati kratke hodnike, u kojima će se okrenuti glavom prema izlazu. Tada grizotinama zatvore svoj hodnik i naprave zipku. Kukuljenje počinje rano u srpnju, a prva imaga nove generacije izlaze već sredinom srpnja. Nova generacija tada izlazi iz debla jele u potrazi za partnerom i novom jelom, prikladnom za stvaranje potomaka (Krcivoj, 2021).

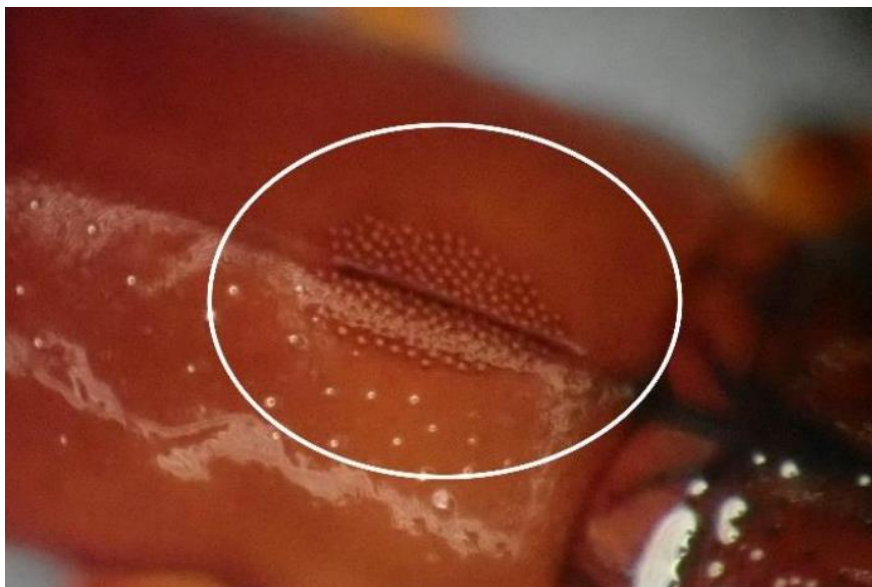
Treptoplastypus oxyurus ima smeđe do tamnosmeđe, vrlo usko, valjkasto i izduženo tijelo, dugačko 4,5 – 5 mm. Spolni je dimorfizam jasno izražen na zatku. Mužjak na zatku ima podijeljene krajeve, razvučene u šiljke (Gogola, 1986). Imaju široko spljoštenu glavu, s bočno smještenim očima i zadebljala kijačasta ticala. Na leđnom dijelu vratnog štita nalaze se mikangiji, koji su veći u ženka, a manji i zakržljali u mužjaka. Pretpostavlja se da je većinom ženka bila zaslužna za prijenos gljiva. Ličinke su blijedo žute boje i sjajne (Krcivoj, 2021).

1.3. Ambrozija kukci

Kao što je već spomenuto, *T. oxyurus*, kao i ostale vrste porodice *Platypodinae* (i neke vrste iz porodice *Scolytidae*) žive u simbiozi sa gljivama. Ta skupina kukaca još se naziva i "Ambrosia beetles". Postoji više od 3000 različitih vrsta ambrozija kukaca, a simbiotske „ambrozija gljive“ potječu od najmanje sedam odvojenih grana gljiva. Naziv „ambrozija kukci“ upućuje na to da postoji jedan rod gljiva koje žive u simbiozi sa srčikarima, *Ambrosiella*, no postoji niz vrsta gljiva koje su tijekom evolucije usvojili kao prehranbene simbiote. Najčešće su to gljive iz rodova *Raffaelea*, *Ambrosiozyma*, i *Dryadomyces* (*Ophiostomatales* i *Microascales*), a rjeđe *Fusarium* (*Hypocreales*) (Alamouti, 2009). Razvojem sistematike i molekularne identifikacije i dalje se otkrivaju neovisne ambrozija gljive unutar poznatih taksona kao što su *Ophiostomatales* i *Ceratocystidaceae*, budući da su mnoge polifiletične. Simbioza kukca i gljive smatra se obaveznim uzajamnim odnosom, jer kornjaši o gljivama ovise zbog izvora hrane, a gljive ovise o kornjašima radi rasprostranjivanja na nova stabla. Pretpostavlja se da su neke gljive zadržale sposobnost širenja na druge načine, no za ostale nije poznato mogu li se

rasprostranjivati neovisno o kornjašima. S obzirom na to da su ambrozija gljive različitog podrijetla, razvile su različite ekološke strategije, tj. njihovi se metabolizmi razlikuju. Na primjer, bazidiomicetne gljive iz roda *Irpex* koje uzgajaju rodovi kornjaša *Ambrosiodmus* i *Ambrosiophilus*, su lignikolne i razgrađuju strukturne komponente drva, za razliku od drugih ambrozija gljiva koje ne razgrađuju drvo, već iz njega izvlače labilne resurse (Allison i sur., 2023).

Ključni dio ove simbioze su posebni organi na tijelu kukca, koji služe za prijenos spora i hifa gljiva. Ti organi nazivaju se mikangije. Mikangije se među vrstama kornjaša razlikuju u veličini, složenosti, anatomskom položaju, spolu jedinke i specifičnostima za gljivične vrste. Odrasle jedinke *T. oxyurus* mikangije imaju na leđnom dijelu vratnog štita (Slika 3).



Slika 3. Mikangij na ženki *T. oxyurus* (foto: prof.dr.sc. Boris Hrašovec).

Simbioza između srčikara i gljiva je mutualistička, tj. jedan organizam ima koristi od drugog, u ovom slučaju: prehranu, zaštitu i širenje. *T. oxyurus* osvajanjem novih stabala jele i kretanjem kroz svoje hodnike, olakšava gljivama njihovo širenje. Hodnici pružaju gljivama zaštitu i povoljne uvjete za rast, npr. vlažnost zraka zbog disanja kukaca. Ličinke su obligatni ksilomicetofagi i nakon izlaska imaju osiguranu prehranu, tj. hrane se micelijima gljiva koje su se razvile na stijenkama njihovih hodničnih sustava (Slika 4) (Šimunović, 2012).



Slika 4. Miceliji gljiva u hodnicima (foto: J.D. Hopkins).

Ovakva simbioza je zanimljiva jer se izmjenjuju uloge domaćina i simbionta kroz njihov zajednički životni ciklus. Tijekom širenja, *T. oxyurus* je domaćin svojoj gljivi simbiontu. Gljiva je zaštićena i hranjena unutar mikangija na tijelu kornjaša. Međutim, nakon što se *T. oxyurus* ubuši u nove hodnike, gljive se oslobađaju iz mikangija u drvo. Tada gljive moraju kolonizirati resurse, odvojiti energiju i hranjive tvari, natjecati se s drugim mikroorganizmima, i odupirati se obrambenim kemijskim spojevima koje proizvode biljke. U međuvremenu, ličinke i novonastale odrasle jedinke *T. oxyurus* hrane se isključivo gljivama. U ovoj fazi gljive djeluju kao domaćini za *T. oxyurus* jer gljive nose teret interakcije s promjenjivom i često neprijateljskom okolinom (Allison i sur., 2023). Drvo je jedno od najvećih svjetskih skladišta biomase, što ovu simbiozu čini jednom od ekološki najuspješnijih (Kostovcik i sur., 2014).

Simbioze kukaca i gljiva u novije vrijeme dobivaju sve više pozornosti, te ih se sve više istražuje i proučava zbog njihovog velikog ekološkog i ekonomskog utjecaja, no, puno je problema vezanih za identifikaciju simbiotskih gljiva. Najčešće se za molekularnu identifikaciju, tj. sekvenciranje, uzimala regija rRNA interne transkribirane razmaknice (ITS), koju je za ove rodove gljiva teško koristiti zbog netočne identifikacije u javnim bazama podataka o sekvencama. Još jedan problem predstavljala je distribucija gljiva na i u tijelu kukaca. Ambrozija kukci žive u okruženju vrlo bogatom gljivama, a simbionti se pojavljuju isključivo na mikangijama i u galerijskim sustavima u drvu, te samo u određenim fazama

života. Stoga je u istraživanjima identificiran velik broj gljiva koje nisu pravi simbionti. Zbog toga postoji nesigurnost u pogledu pravih simbionta (Kostovcik i sur., 2014).

Dugo se smatralo da ambrozija kukci žive u simbiozi sa samo određenim vrstama gljiva, tj. da za jednu vrstu kornjaša postoji jedna dominantna gljiva simbiot. Batra (1966, 1967) se uprotivio tom stajalištu i tvrdi da u mnogim slučajevima više različitih vrsta istog roda gljiva mogu biti primarni simbionti, a nekada su primarni simbionti jedne vrste kornjaša za druge vrste sekundarni, tj. pomoćni. Uloga pomoćnih vrsta gljiva i dalje je nejasna, no pretpostavlja se da služe kao izvor hrane tijekom razvoja legla ili pomoć pri prilagodbi kornjaša u novom okruženju smanjenjem obrane stabla domaćina i stvaranjem uvjeta za bolju kolonizaciju primarnog simbionta (Nel i sur., 2021).

1.4. Molekularna identifikacija gljiva

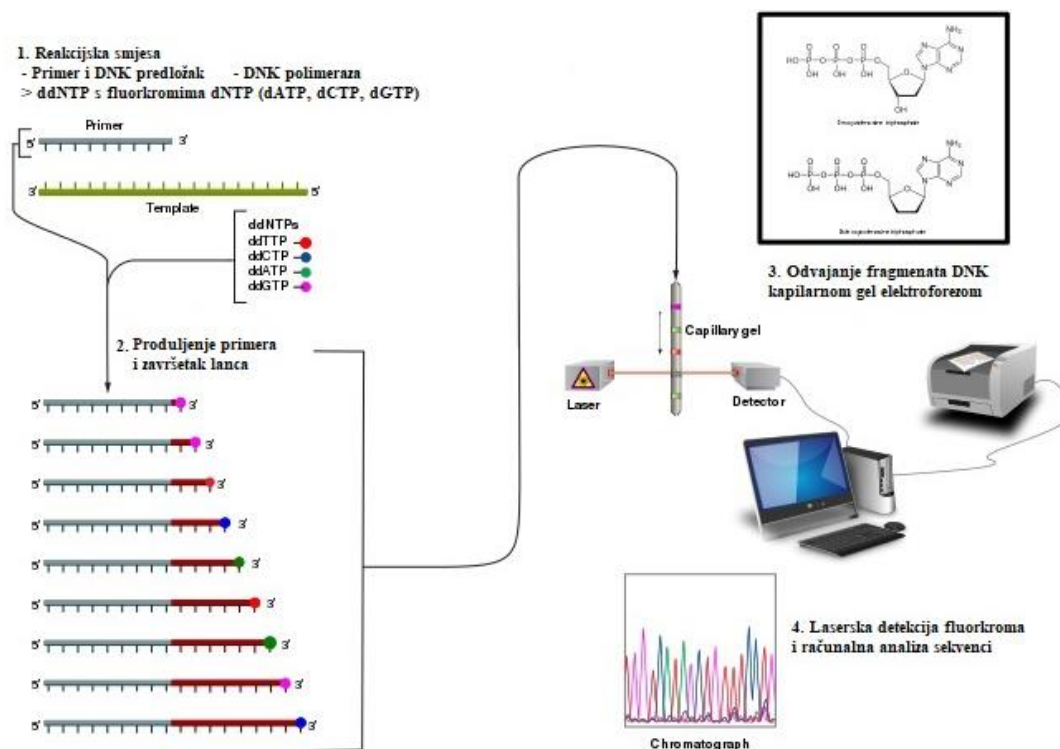
Klasična metoda identifikacije gljiva je dugo vremena bila morfološka identifikacija. Morfologija filamentoznih gljiva rezultat je rasta hifa koje su cilindrične, nitaste strukture promjera 2-10 μm , dugačke do nekoliko centimetara i mogu se razlikovati u boji, veličini i obliku. Međutim, s morfološke strane gledišta, najveće razlike između pojedinih taksona gljiva su u građi njihovih plodišta i spora, čiju je produkciju katkada teško ispoljiti u laboratorijskim uvjetima. Morfološka identifikacija gljiva predstavljala je problem zbog toga što zahtijeva puno vremena, te je potrebno iskustvo i vještina za razlikovanje vrsta. Za razliku od morfološke, molekularna identifikacija pruža brzo, dostatno i ponovljivo istraživanje i može pružiti veliku specifičnost za razlikovanje vrsta i podvrsta gljiva. Molekularna identifikacija temelji se na ekstrakciji gljivične DNK te umnažanju ciljanih regija DNK koje predstavljaju kritični kod za određivanje i identifikaciju izolata gljiva do razine vrste. Ta je metoda postala osnovni alat za mikologe koji proučavaju taksonomiju gljiva, evoluciju i populacijsku genetiku, te se provodi sekvenciranjem PCR pojačanog dijela gena 18S rRNK s univerzalnim početnicama za vrste gljiva (Alsohaili i sur., 2018).

Često za identifikaciju služe sljedeće tri regije DNK: LSU, TUB, i ITS. Large subunit (LSU) rRNA, tj. velika podjedinica ribosomske ribonukleinske kiseline najveća je od dvije glavne komponente RNA ribosoma. Njena se struktura sastoji od očuvane jezgre koja je prošarana varijabilnim regijama. Osobito kod eukariota te regije mogu jako varirati u nizu kao i duljini, čak i između relativno blisko povezanih vrsta (De Rijk i sur., 2000). Internal transcribed spacer

(ITS) odnosi se na razmaknicu DNA koja se nalazi između gena male podjedinice rRNA i velike podjedinice rRNA u kromosomu. ITS regija je najčešće sekvencirana regija DNA u molekularnoj identifikaciji gljiva, zbog toga što ju je lako otkriti čak i iz malih količina DNK i ima visok stupanj varijacije između blisko povezanih vrsta (Sharma i sur., 2023). Beta-tubulin (TUB) je važan multifunkcionalni protein eukariota koji se nalazi u citoskeletu i odgovoran je za stvaranje tubulina, struktura odgovornih za morfologiju stanice i koje pomažu u pokretljivosti i unutarstaničnom transportu. Korišten je kao genotipski marker za proučavanje evolucijske povijesti i filogenetskih odnosa između eukariotskih organizama (Kundu i sur., 2015).

Razvijene su brojne metode sekvenciranja DNA. Te metode razlikuju se po brzini, preciznosti, duljini očitavanja sekvenci DNA, cijeni, te pripremi samih uzoraka za analizu. Podijeljene su u tri generacije; prvu generaciju čine Sangerova i Maxam-Gilbertova metoda, u drugu generaciju spada pirosekvenciranje i metoda ligacijskog sekvenciranja, i treću generaciju čine monomolekularno sekvenciranje u stvarnom vremenu i sekvenciranje pomoću nanopora (Trupković, 2018).

Sangerovo sekvenciranje, također poznato kao sekvenciranje prekida lanca, odnosi se na metodu sekvenciranja DNK koju je razvio Frederick Sanger 1977. godine. Ova se metoda temelji na umnožavanju fragmenta DNA koji će se sekvencirati pomoću DNA polimeraze i ugradnji modificiranih nukleotida, tj. dideoksinukleotida (ddNTP). Klasična metoda prekida lanca zahtijeva jednolančanu DNA šablonu, DNA primer, DNA polimerazu, normalne deoksinukleotidtrifosfate (dNTP) i modificirane nukleotide (dideoksiNTP) koji prekidaju produljenje DNA lanca (Slika 5) (LibreTexts). Ovim nukleotidima koji završavaju lanac nedostaje 3'-OH skupina potrebna za stvaranje fosfodiesterske veze između dva nukleotida, što uzrokuje da DNA polimeraza prestane produljivati DNA kada se ugradi modificirani ddNTP. ddNTP-ovi mogu biti radioaktivno ili fluorescentno obilježeni za detekciju u automatiziranim strojevima za sekvenciranje (Wikipedia).



Slika 5. Sangerovo sekvenciranje (Izvor: Estevezj 2012, prevedeno na hrvatski).

Različite regije gena koriste se za identifikaciju različitih skupina organizama pomoću barkodiranja. Dosad je, uz ITS regiju, pronađeno još šest DNK regija koje su potencijalni DNK barkodovi za gljive, drugo najveće kraljevstvo eukariota: velika i mala ribosomska podjedinica (LSU, SSU), ribosomska polimeraza B1 i B2 (RPB1, RPB2), faktor elongacije translacije 1- α (TEF1) i mala podjedinica mitohondrijskog ribosomskog operona (mtSSU). Regija mitohondrijske podjedinice citokrom c oksidaze 1 (COI ili COX1) koja se koristi kao crtični kod životinja bila je isključena kao potencijalni kod, jer nije dovoljno varijabilna (Seifert, 2009).

U NCBI GenBank, javno dostupnoj bazi gena, postoji više od 7800 prijavljenih vrsta „nekultiviranih gljiva”, „nekultiviranih gljiva u tlu” i „nekultiviranih endofitnih gljiva”. Međutim, njihov izgled nije poznat. Kako bi se odredile vrste, barkodovi gljiva morat će biti precizniji. Među regijama ribosomalnog cistrona, unutarnja transkribirana razmaknica (ITS) regija unutar ribosomske RNA ima najveću vjerojatnost uspješne identifikacije za najširi raspon gljiva. Iznimku čine kvasaci, kod kojih je LSU postao standard za identifikaciju (Seifert, 2009).

Bez obzira na višestruke prednosti, molekularne metode identifikacije gljiva mogu biti i problematične te katkada dati nepotpune, nejasne ili netočne rezultate, jer se oslanjaju na usporedbu sekvenci DNK sa *online* bazom gena u koju je moguće unijeti vlastite DNK sekvence sa pripadajućim podacima bez opsežne provjere. Stoga je uvijek nužno dodatno se oslanjati i na morfološki izgled micelija te također pratiti najnovije spoznaje vezano uz taksonomiju i klasifikaciju vrsta.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Jelin valjkasti srčikar, *T. oxyurus*, je otkriven u hrvatskim šumama 2010. godine na običnoj jeli. Ima disjunktan areal. Prisutan je u Njemačkoj i Slovačkoj, no nije pronađen ni u jednoj od susjednih zemalja Hrvatske (Bosna i Hercegovina, Slovenija), niti u širem okruženju (Albanija, Austrija, Bugarska, Češka, Makedonija, Poljska, Rumunjska, Švicarska) u kojem obična jela dolazi od prirode. Poznato je da pridolazi na oslabljenim stablima obične i grčke jele i da obično nije uzrok fiziološke slabosti stabala, već njihove smrti. U Hrvatskoj jela zauzima 35 % udjela u drvnoj zalih i četinjača i jedna je od tradicionalno, ekonomski i ekološki najvažnijih vrsta. Šume Gorskog kotara su 2014. i 2017. godine pogođene klimatskim ekstremima. Budući da nisu sva oborena ili oštećena stabla uklonjena iz šume, postoji mnogo stabala koja su pogodna za razvoj jelinog valjkastog srčikara (Hrašovec, 2011). Da bi se mogla predvidjeti i pravovremeno spriječiti gradacija ovog srčikara, potrebno je provesti što više istraživanja o njegovoj biologiji i načinu života. Također je zanimljiv njegov trenutno poznati, isprekidani areal, koji se potencijalno može dovesti u svezu sa rasprostranjenošću i pridolaskom simbiotskih gljiva.

Cilj ovog rada bio je identificirati vrste gljiva izolirane u obliku čistih kultura micelija iz uzoraka hodnika jelinog valjkastog srčikara, s obzirom da njegov životni ciklus uvelike ovisi o gljivama simbiotima i stoga je važno znati koje su to gljive, ako je moguće, do razine vrste. Stoga je za ovo istraživanje korištena molekularna metoda identifikacije, da bi se brže i preciznije istražilo o kojim se simbiotskim gljivama radi.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Čiste kulture gljiva korištene za identifikaciju

Za identifikaciju gljiva nađenih u hodničnom sustavu jelinog valjkastog srčikara, korištene su čiste kulture micelija (Tablica 1) izoliranih iz hodnika i sa jedinki potkornjaka u prethodnom istraživanju (Žgela, 2021). Čiste kulture su bile pohranjene na -80 °C u vodenoj otopini glicerola (15 % v/v). Miceliji su dobiveni iz tri različita uzorka debla obične jele, stavljanjem komadića hodnika (iz različitih dubina u deblu) i samih insekata nađenih u hodnicima, na hranjive podloge (Potato Dextrose Agar) u Petrijeve zdjelice.

Tablica 1. Popis korištenih micelija.

Uzorak iz kojeg je micelij dobiven	Oznaka micelija	Napomena
J1K1H2	1.3	DNK izolirana u ovom istraživanju.
J1K2H5	2.1	
J1K2H3	2.2	
J1K2H4	2.4	
J1K2H4	2.5	
J1K2H5	2.7	
J1K2H5	2.10	
J1K3H6	3.1	
J1K3H6	3.4	
J1K3H6	3.5	
J1K3H7	3.6	
J1K3H7	3.7	
J1K3H7	3.8	
J1K3H7	3.9	
J1K3H7	3.10	
J1K3H7	3.11	
J1K4H8	4.1	
	4.1B	
J1K4H10	4.4	
J1K4H10	4.5	
J1K4H10	4.6	
J1K4H11	4.8	
	4.8B	
J1K4H11	4.10	

Nastavak – Tablica 1. Popis korištenih micelija.

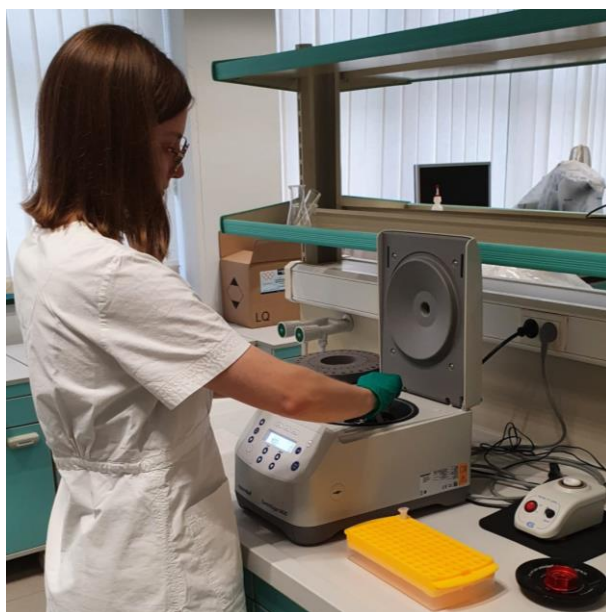
Uzorak iz kojeg je micelij dobiven	Oznaka micelija	Napomena
MUŽJAK	OI16	DNK izolirana u ovom istraživanju.
MUŽJAK/ŽENKA	OI19	
J2D3H3	01	DNK izolirana u prethodnom istraživanju.
J2D1H9	02	
J2D1H1	03	
J2D1H6	04	
J2D2H1	05	
?	06	
J2D1H5	07	
J2D1H1	08	
J2D1H7	09	
J2D2H3	010	
?	011	
?	012	
?	013	
J2D1H9	014	
J2D3H2	015	
?	016	
?	017	
J2D2H4	018	
J2D2H3	019	DNK izolirana u ovom istraživanju.
J2D2H3	019N	
J2D2H?	020	DNK izolirana u prethodnom istraživanju.
J2D2H1	021	
J2D1H6	022	
J2D2H2	023	
J2D2H2	023N	DNK izolirana u ovom istraživanju.
J2D3H2	024	DNK izolirana u prethodnom istraživanju.
?	025	
J2D2H3	026	
KONIDIJSKA GLAVICA	035	DNK izolirana u ovom istraživanju.
J3 D1H1 / D2H6 / D1H5 / D2H7 / MIKANGIJ	053	
J3D3H14	065	
J3D2 LIČINKA	066	
J - jela; D - dubina; H – hodnik		

3.2. Izolacija DNK iz čistih kultura micelija

U ovome je istraživanju izolirana DNK iz 32 čiste kulture micelija/stanica. Izolacija DNK je vršena metodom isoljavanja uz korištenje pufera za lizu i natrijevog acetata ($C_2H_3NaO_2$, 3 M, pH 5,2). Metoda isoljavanja (anorganska ekstrakcija) koristi zasićenu otopinu natrijevog acetata za odvajanje molekule DNK od staničnih ostataka i proteina, pri čemu NaAc lijepi stanične ostatke i proteine jedne za druge, te oni stvaraju sediment na dnu epruvete centrifugiranjem, dok molekula DNK ostaje u supernatantu.

Miceliji su presađeni u ME (Malt Extract) tekuću hranjivu podlogu u mikroepruvete (2 ml). Nakon sedam dana rasta, podvrgnuti su izolaciji DNK. Epruvete su prvo centrifugirane 5 minuta na najvećoj brzini (20 000 x g), nakon čega je hranjiva podloga ispipetirana iz epruveta. U svaku epruvetu je dodano 300 μ l pufera za lizu (20 mM Tris, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10 % SDS, pH 8,0) i jedna sterilna čelična kuglica. Miceliji su zatim izloženi trešnji od 30 Hz u trajanju od 3 min u homogenizatoru, uređaju TissueLyser II. U epruvete je dodan natrijev acetat (pH 5.2 \pm 0.1, 3 M), zatim su inkubirane na -20 °C u trajanju od 10 min i centrifugirane na 13 000 rpm 5 minuta (Slika 6).

Nakon centrifugiranja, nastali supernatant (vodena otopina DNK) je ispipetiran u nove epruvete u koje je potom dodan jednak volumen izopropanola (250 μ l). Epruvete su inkubirane 5 min na 4 °C (u hladnjaku), i potom centrifugirane na 4 °C i na 15 000 rpm u trajanju od 20 minuta. Izopropanol je pažljivo odliven iz epruveta u koje je dodan ledeno-hladni apsolutni etanol (500 μ l). Epruvete su ponovno centrifugirane na 4 °C i na 20 000 rpm u trajanju od 3 minute. Etanol je potom ispipetiran iz epruveta koje su stavljene u termoblok na 38 °C u trajanju od 5 do 10 minuta kako bi se DNK osušila.



Slika 6. Centrifugiranje epruveta.

Na kraju je u epruvete dodano po 50 μ l 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 °C.

3.3. Analiza dobivenih uzoraka DNK u lančanoj reakciji polimerazom (PCR)

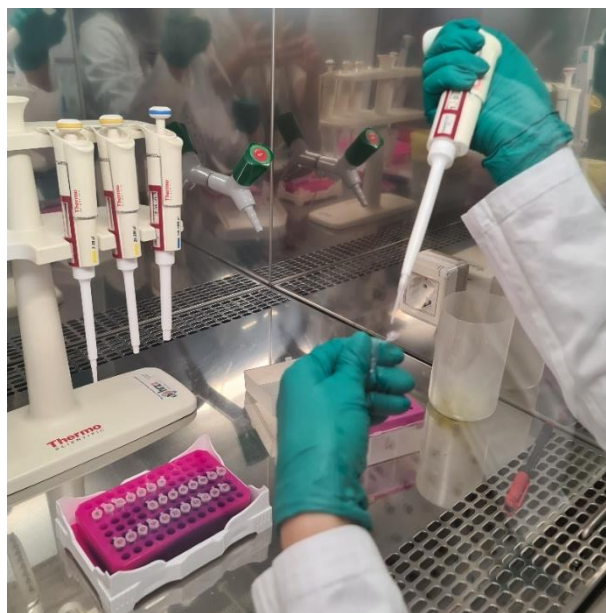
Lančanoj je reakciji polimerazom u PCR uređaju (Slika 7) podvrgnuto ukupno 58 uzoraka dobivene DNK, 32 uzorka koji su izolirani iz micelija u ovome istraživanju, te dodatno 26 uzoraka koji su dobiveni u prethodnom istraživanju i bili pohranjeni na -80 °C u TE puferu.

Uzorci DNK iz prijašnjeg istraživanja (Žgela, 2021) su ponovno podvrgnuti analizi radi nezadovoljavajućih rezultata dobivenih u prvome pokušaju, tj. ciljana regija DNK (ITS regija) se nije pokazala dovoljno preciznom za navedene micelije gljiva, te su u ovome istraživanju analizirane LSU i TUB regija. Za 32 uzorka DNK izolirane u ovome istraživanju, su analizirane ITS, LSU i TUB regija. Izolacija genomske DNA odrađena je u Molekularno-biološkom laboratoriju Zavoda za šumarsku genetiku, dendrologiju i botaniku na Fakultetu šumarstva i drvene tehnologije.



Slika 7. Uređaj za PCR.

Sve PCR reakcije su pripremljene u volumenu od 65 μ l, a konačne koncentracije pojedinih sastojaka smjese za PCR (Tablica 2) te uvjeti reakcije (Tablice 3-5) su preuzeti iz literature (Lehenberger i sur., 2021). Za umnažanje ITS regije korištene su početnice ITS 1 i ITS 4 (White i sur., 1990), LSU regije početnice LR0R i LR5 (Vilgalys i Hester, 1990; Rehner i Samuels, 1994), te TUB regije početnice T10 i Bt2B (Glass i Donaldson, 1995; O'Donnell i Cigelnik, 1997) (Slika 8).



Slika 8. Pipetiranje PCR Master Mix-a u epruvete.

Tablica 2. Koncentracije pojedinih sastojaka za PCR smjesu.

Sastojak*	Početna koncentracija	Konačna koncentracija za reakciju	Volumen za 1 reakciju (μl)
PCR Master Mix	2 x	1 x	32,5
Početnica 1	10 μM	0,5 μM	3,25
Početnica 2	10 μM	0,5 μM	3,25
Sterilna H ₂ O	-	-	23,05
DMSO	100 %	3 %	1,95
DNA kalup	-	3-90 ng/μl	1
Ukupno			65

* Korišten je Thermo Scientific Phusion High-Fidelity PCR Master Mix koji sadrži pufer, nukleotide i polimerazu. Korištena su tri različita para početnica, ovisno o ciljanoj regiji DNK (ITS1 + ITS4, LR0R + LR5, T10 + Bt2B).

Tablica 3. Uvjeti PCR reakcije za ITS (Internal Transcribed Spacer) regiju.

Početna denaturacija	35 ciklusa			Završno produljivanje lanca DNA
	Denaturacija	Sparivanje početnica	Produljivanje lanca DNA	
30 s na 98 °C	10 s na 98 °C	30 s na 54.5 °C	20 s na 72 °C	10 min na 72 °C

Tablica 4. Uvjeti PCR reakcije za LSU (Large Ribosomal Subunit) regiju.

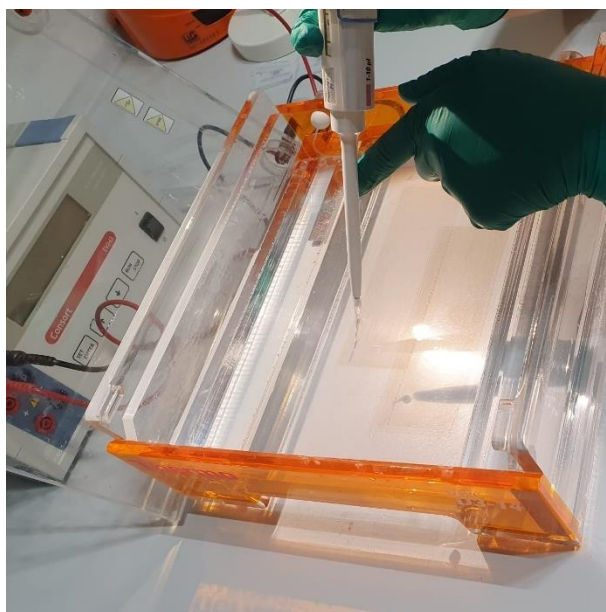
Početna denaturacija	35 ciklusa			Završno produljivanje lanca DNA
	Denaturacija	Sparivanje početnica	Produljivanje lanca DNA	
30 s na 98 °C	10 s na 98 °C	30 s na 55.5 °C	20 s na 72 °C	10 min na 72 °C

Tablica 5. Uvjeti PCR reakcije za TUB (Partial Beta-Tubulin) regiju.

Početna denaturacija	35 ciklusa			Završno produljivanje lanca DNA
	Denaturacija	Sparivanje početnica	Produljivanje lanca DNA	
30 s na 98 °C	10 s na 98 °C	30 s na 57.5 °C	20 s na 72 °C	10 min na 72 °C

3.4. Provjera PCR produkata elektroforezom

Specifičnost, duljina (pb) te približna koncentracija dobivenih PCR produkata provjerene su elektroforezom u 1,5 % agaroznom gelu pri naponu od 65 V, te u trajanju od 90 minuta. U gel je prethodno dodana boja za vizualizaciju nukleinskih kiselina GelStar Nucleic Acid Gel Stain (Lonza Rockland, SAD) konačne koncentracije 1x. U jažice gela nanošeno je po 1 µl svakog PCR produkta pomiješanog s 4 µl sterilne destilirane vode (razrjeđenje zbog visoke koncentracije dobivenih produkata) te 1 µl pufera za nanošenje uzoraka (6x DNA Loading Buffer, TransGen Biotech, Kina) (Slika 9). Nakon završene elektroforeze PCR produkti su na gelu vizualizirani i fotografirani pomoću UV transiluminatora s kamerom (Bio-Imaging Systems DNR, MiniBIS Pro) te računalnog programa GelCapture.



Slika 9. Nanošenje PCR produkta u jažice gela.

3.5. Sekvenciranje DNK

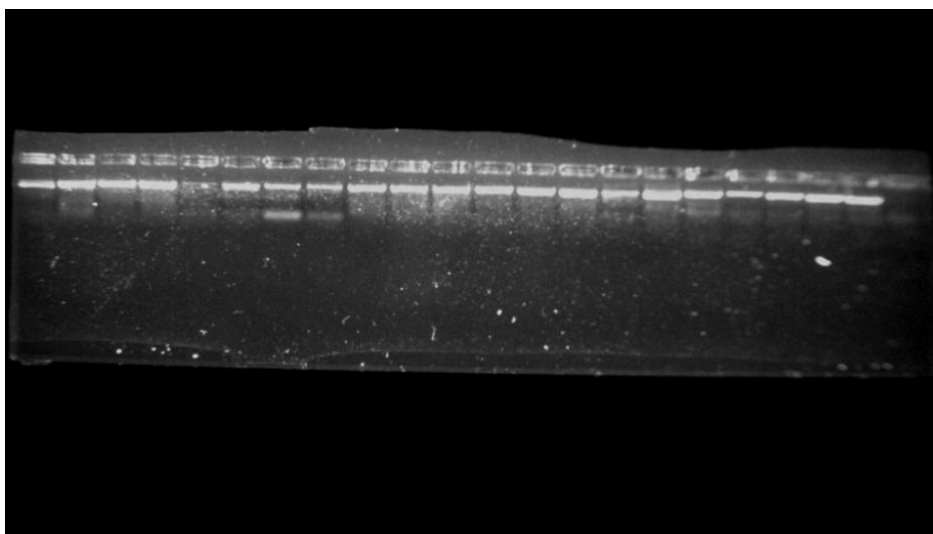
Dobiveni nepročišćeni PCR produkti su slani u MacroGen Inc. (Amsterdam, Nizozemska) na sekvenciranje.

Kromatogrami dobiveni sekvenciranjem provjereni su i obrađeni u računalnom programu BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.2.5 (Hall, 1999). Izolati su identificirani usporedbom obrađenih sekvenci s postojećima u bazi gena NCBI GenBank primjenom algoritma BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul i sur., 1990).

Za identifikaciju na razini vrste u obzir su uzimane sekvence s podudarnošću od najmanje 98 % na najmanje 80 % duljine ispitivane sekvence, dok su one s podudarnošću od 94 – 97 % na također najmanje 80 % duljine ispitivane sekvence korištene za identifikaciju na razini roda ili druge više taksonomske jedinice (Bakys i sur., 2009a; Bakys i sur., 2009b; Bakys i sur., 2011).

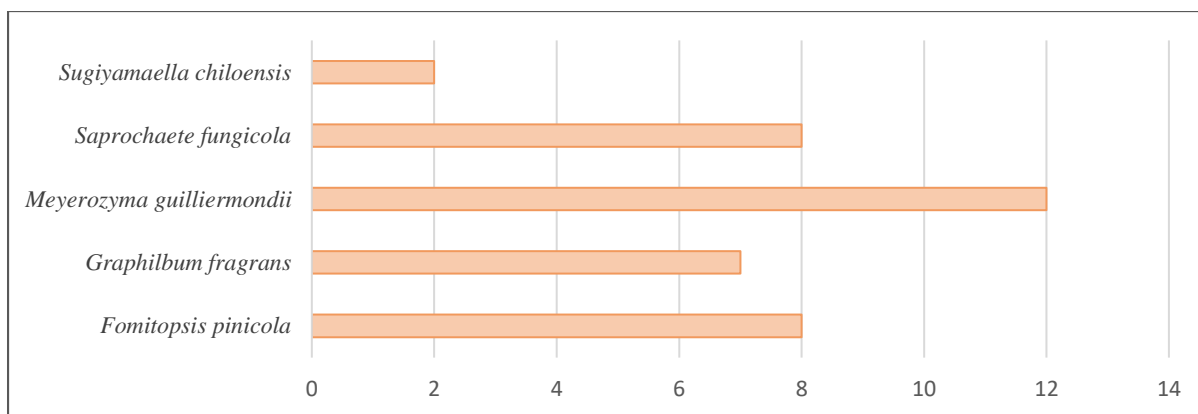
4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

Umnažanje ITS regije u PCR reakciji je bilo uspješno za 22 od podvrgnutih 32 uzorka DNK, dok je sekvenciranje bilo uspješno za svega 4 PCR produkta, od njih 22 poslanih u Macrogen. Umnažanje TUB regije u PCR reakciji je bilo uspješno za svega 10 od podvrgnutih 58 uzoraka DNK, dok je sekvenciranje bilo uspješno za 6 od 10 PCR produkata poslanih u Macrogen. Umnažanje LSU regije u PCR reakciji je bilo uspješno za 53 od podvrgnutih 58 uzoraka DNK (Slika 10), dok je sekvenciranje bilo uspješno za 45 od 53 PCR produkata poslanih u Macrogen.



Slika 10. Agarozni gel sa PCR produktima dobivenim umnažanjem LSU regije.

Od ukupno 45 PCR produkata, na temelju LSU regije DNK, njih 37 je identificirano kao pet vrsta s podudarnošću od 98,00 % ili više (Slika 11), četiri su identificirana kao tri roda s podudarnošću sekvenci od 95,00 % do 97,00 %. Ostala 4 PCR produkta nisu identificirana (Tablica 6).



Slika 11. Grafički prikaz identificiranih vrsta i pripadajućeg broja uzoraka (izolata, micelija) na temelju LSU regije.

Tablica 6. Popis dobivenih vrsta gljiva; LSU regija.

Naziv izolata	Duljina dobivene sekvence	Najsrodnija vrsta prema BLAST algoritmu	Pristupni broj sekvence najveće podudarnosti	Pokrivenost sekvence (%)	Podudarnost sekvence (%)
1.3	858	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	KY108525.1	99	100
2.2	842	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	KY108543.1	100	100
2.4	864	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	KY108543.1	100	100
2.7	867	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	KY108525.1	100	99.77
2.10	843	<i>Graphilbum fragrans</i>	MH868872.1	100	99.65
3.1	884	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	KY108543.1	100	100
3.4	890	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	KY108543.1	100	99.89
3.5	889	<i>Penicillium thomii</i>	MH877410.1	100	100
3.6	893	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	KY108542.1	100	100
3.7	891	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	KY108543.1	100	100
3.8	914	<i>Fomitopsis pinicola</i>	MH086796.1	99	100
3.10	883	<i>Graphilbum fragrans</i>	MH868872.1	100	99.77
3.11	925	<i>Fomitopsis pinicola</i>	MH086796.1	100	99.89
4.1A	890	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	KY108543.1	100	99.78
4.1B	860	<i>Ambrosiozyma monospora</i>	NG_055195.1	100	97.68
4.4	898	<i>Fomitopsis pinicola</i>	MH086796.1	100	99.89
4.6	893	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	KY108542.1	100	99.89
4.8	885	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	KY108543.1	100	100
OI16	883	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	KY108543.1	99	99.77
01	698	<i>Saprochaete fungicola</i>	MK834540.1	96	99.85

Nastavak – Tablica 6. Popis dobivenih vrsta gljiva; LSU regija.

Naziv izolata	Duljina dobivene sekvence	Najsrodnija vrsta prema BLAST algoritmu	Pristupni broj sekvence najveće podudarnosti	Pokrivenost sekvence (%)	Podudarnost sekvence (%)
02	867	<i>Graphilbum fragrans</i>	MW046113.1	97	100
03	869	<i>Trigonopsis cantarellii</i>	KY109971.1	100	96.21
04	855	<i>Sugiyamaella chiloensis</i>	KY109799.1	100	100
07	859	<i>Sugiyamaella chiloensis</i>	KY109799.1	100	99.88
08	863	<i>Ambrosiozyma monospora</i>	NG_055195.1	100	96.77
09	668	<i>Saprochaete fungicola</i>	MK834540.1	100	99.7
010	681	<i>Fomitopsis pinicola</i>	MH086810.1	100	100
011	1013	<i>Mortierella echinula</i>	MH871899.1	100	95
013	847	<i>Graphilbum fragrans</i>	MH868872.1	100	99.65
014	702	<i>Fomitopsis pinicola</i>	MH086810.1	100	100
016	686	<i>Saprochaete fungicola</i>	MK834540.1	96	100
017	873	<i>Graphilbum fragrans</i>	MH868872.1	96	99.53
018	859	<i>Graphilbum fragrans</i>	MH868872.1	96	100
019	701	<i>Saprochaete fungicola</i>	MK834540.1	100	100
020	682	<i>Graphilbum fragrans</i>	MH868872.1	96	100
021	674	<i>Saprochaete fungicola</i>	MK834540.1	96	99.69
022	682	<i>Saprochaete fungicola</i>	MK834540.1	96	99.85
023	703	<i>Saprochaete fungicola</i>	MK834540.1	96	100
026	891	<i>Trigonopsis cantarellii</i>	KY109969.1	97	95.96
035	806	<i>Fomitopsis pinicola</i>	MH086810.1	96	99.87
053	914	<i>Fomitopsis pinicola</i>	MH086796.1	97	99.89
065	910	<i>Fomitopsis pinicola</i>	MH086796.1	97	99.89
066	688	<i>Saprochaete fungicola</i>	MK834540.1	96	99.85

Sekvenciranjem ITS regije DNK, od ukupno 22 PCR produkta, njih svega 4 su identificirana kao dvije vrste, s podudarnošću sekvenci većom od 99,77 % (Tablica 7).

Tablica 7. Popis dobivenih vrsta gljiva; ITS regija.

Naziv izolata	Duljina dobivene sekvence	Najsrodnija vrsta prema BLAST algoritmu	Pristupni broj sekvence najveće podudarnosti	Pokrivenost sekvence (%)	Podudarnost sekvence (%)
3.6	530	<i>Fomitopsis pinicola</i>	KT943920.1	100	100
3.8	432	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	MT539193.1	100	99.77
4.5	475	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	MT645413.1	100	100
023	448	<i>Fomitopsis pinicola</i>	MT561407.1	92	100

Sekvenciranjem TUB regije, identificirano je šest PCR produkata od njih 10. Od toga je samo jedna vrsta identificirana sa zadovoljavajućom podudarnošću od 99,24 %. Ostalih 5 je identificirano sa podudarnošću manjom od 96,54 % (Tablica 8).

Tablica 8. Popis dobivenih vrsta gljiva; TUB regija.

Naziv izolata	Duljina dobivene sekvence	Najsrodnija vrsta prema BLAST algoritmu	Pristupni broj sekvence najveće podudarnosti	Pokrivenost sekvence (%)	Podudarnost sekvence (%)
2.1	521	<i>Penicillium subspinulosum</i>	OK572521.1	94	96.54
3.1	693	<i>Acremonium exuviarum</i>	AY882947.1	22	93.63
3.5	523	<i>Penicillium lanosum</i>	DQ285623.1	100	99.24
4.1 B	460	<i>Zancluspora aurea</i>	MW147343.1	68	94.84
019	652	<i>Ophiostoma piliferum</i>	MT210392.1	23	93.42
065	656	<i>Ophiostoma piliferum</i>	MT210392.1	23	93.59

Kod izolata 3.6 i 3.8 su sekvenciranjem dvije različite regije DNK dobiveni različiti rezultati identifikacije vrste. Analizom LSU regije je izolat 3.6 identificiran kao vrsta *Meyerozyma guilliermondii*, dok je analizom regije ITS isti izolat, identificiran kao vrsta *Fomitopsis pinicola*. U oba su slučaja podudarnost i pokrivenost sekvence 100%-tni. Izolat 3.8 je analizom LSU regije identificiran kao *Fomitopsis pinicola* s podudarnošću i pokrivenošću sekvence od 100%, dok se analizom ITS regije pokazalo da se podudara sa vrstom *Meyerozyma guilliermondii* sa 99,77% uz 100%-tnu pokrivenost sekvence. Za ta dva izolata (3.6 i 3.8) ne možemo sa sigurnošću utvrditi o kojoj se vrsti radi, jer je moguće da kulture micelija nisu bile čiste, tj. da su u Petrijevoj zdjelici bila dva micelija, ili da je tijekom analize došlo do unakrsne kontaminacije.

5. RASPRAVA

Najuspješnija od tri DNK regije je bila LSU, sa 77,6 % identificiranih PCR produkata. Manje uspješna bila je ITS regija, sa 10,3 % identificiranih uzoraka, od kojih je pola dovoljno pouzdano za utvrđivanje vrste, a ostale imaju dvojni rezultat. TUB regija se pokazala najmanje uspješnom za identifikaciju, sa samo 12,5 % identificiranih uzoraka, od kojih je samo jedan dovoljno pouzdan za utvrđivanje vrste.

5.5. Identificirane vrste gljiva

Najveći je broj izolata, njih 12, identificirano kao vrsta kvasca *Meyerozyma guilliermondii*, poznata po imenu *Pichia guilliermondii*, do preimenovanja 2010. godine. *Pichia* je rod telemorfni kvasaca iz porodice *Saccharomycetaceae*. Za neke vrste roda *Pichia* smatra se da su oportunistički patogeni, tj. uzrokuju infekcije samo u slučaju da obrambeni mehanizam domaćina oslabi uslijed stresa, bolesti i sl. Anamorfni oblik *M. guilliermondii* zove se *Candida guilliermondii*, koja je često uzrok kožnih infekcija kod ljudi. Kolonije *C. guilliermondii* su krem do žute boje, vlažne, glatke i ravne (Slika 12). Nedavno je genom ove vrste kvasca sekvenciran i postao javno dostupan (Sibirny i sur., 2009). Također je izoliran iz morske vode, izmeta životinja, smokvinih osa, ribljih ljuska i piva (WikiDoc).

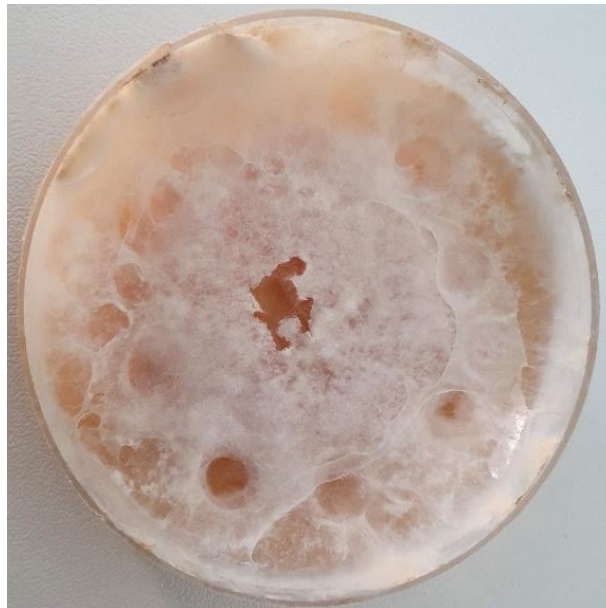
Za kvasac *C. guilliermondii* već je poznato da sudjeluje u simbiozi sa kukcem jer njegov varijetet *C. guilliermondii* var. *carpophila* zajedno sa bakterijom *Serratia plymuthica* prenosi smokvina osa oprašivač *Blastophaga psenes*. Dok smokvina osa ne uđe plod smokve (*Ficus carica*), njegovo unutarnje tkivo je zdravo. Ovi organizmi ne uzorkuju kvarenje, već povećavaju privlačnost ploda za male voćne mušice roda *Drosophila*. *Drosophila* na svom tijelu nosi kvasce i bakterije kvarenja i unosi ih u plod smokve tijekom polaganja jaja u šupljinu ploda (Miller i Phaff, 1962).



Slika 12. Izolat 4.1 – *Meyerozyma guilliermondii*.

Yun i sur. (2015) su ovu vrstu kvasca ustanovili na tijelu ličinki i odraslih kukaca vrste *Platypus koryoensis*, koji napada vrste roda *Quercus* (hrast). Autori navode da su *M. guilliermondii* i *Candida kashinagacola* dominantne vrste među osam identificiranih jer posjeduju sposobnost proizvodnje 6 od istraživanih 7 izvanstaničnih enzima (amilaza, avicelaza, β -glukozidaza, CM-celulaza; ksilanaza, pektinaza, proteaza). Ti enzimi korisni su za korištenje komponenti drva kao izvora hranjivih tvari te omogućuju kvascima život u drvenom okruženju u kojem živi kornjaš. No, od osam vrsta kvasaca, ni jedan nije imao sposobnost proizvodnje svih sedam izvanstaničnih enzima, što znači da bi drvene komponente bolje iskoristila skupina kvasaca, nego samo jedna vrsta. Budući da *P. koryoensis* većinu života provede u deblu stabla domaćina i koristi gljive simbiote za iskorištavanje ksilema siromašnog hranjivima, autori zaključuju da je udruživanje različitih kvasaca koji mogu kolonizirati drvo korisno za *P. koryoensis*. Iz navedenog se može zaključiti kako je i za uspješnu kolonizaciju jele vrstom *Treptoplatypus oxyurus*, također zaslužan kvasac *M. guilliermondii*, zahvaljujući prethodno opisanoj enzimatskoj aktivnosti. I u ovome istraživanju je ovaj kvasac izoliran sa tijela odraslih kukaca, ali i samih hodničnih sustava, i to u velikom broju. Doduše, ne treba isključiti i agresivan rast kultura stanica kvasca kao jedan od razloga njegove dominacije među dobivenim čistim kulturama gljivama u ovome istraživanju.

Osam čistih kultura micelija (Slika 13) je identificirano kao vrsta *Fomitopsis pinicola* (crvenorubna guba), višegodišnja gljiva koja uzrokuje smeđu trulež drva. Ova truležnica raste na mrtvim granama i panjevima četinjača, nekad i na živim stablima. Ime roda „*Fomitopsis*” dobila je zbog sličnosti s vrstom *Fomes fomentarius* (bukova guba), a „*pinicola*” jer se najčešće pojavljuje na drveću roda *Pinus*. Njezin areal širi se na Europu i Aziju. Crvenorubna guba obavlja bitne funkcije u kruženju tvari u šumama kroz razgradnju mrtvih stabala, te utječe na strukturu i sukcesiju u prašumama. Plodno tijelo je sjajno, crveno-smeđe, lepezastog oblika, ima tvrdnu drvenastu strukturu, a može narasti do 40 cm u promjeru (Slika 14). Raste stvaranjem dodatnog sporonosnog sloja svake godine (Bishop, 2020). *Fomitopsis pinicola*, kao i mnoge druge gljive, uglavnom se identificira morfološki, ali zahtijeva tehnike molekularne biologije za potvrdu identifikacije. Internal spacer region (ITS) sekvenciranje je prikladna metoda koja se koristi za točnu identifikaciju. Nažalost, može izgledati morfološki slično vrsti *Ganoderma lingzhi* i drugim vrstama iz roda *Fomitopsis*, pa je stoga važno potvrditi identifikaciju analizom DNK (Bishop, 2020).



Slika 13. Izolat 3.8 – *Fomitopsis pinicola*.



Slika 14. *Fomitopsis pinicola* (foto: Justin Long, 2019).

Plodna tijela (sporokarpe) gljiva truležnica, često posjećuju različiti kornjaši, pri čemu za vrijeme izbacivanja spora fizički uklanjaju spore, tj. oslobađaju ih kada jedu ili hodaju po himeniju, a poznato je da raznovrsna zajednica kukaca živi unutar mrtvih i živih sporokarpa. U istraživanju provedenom u Norveškoj, Hågvar (2018) navodi da se u porama crvenorubne gube, *F. pinicola*, mogu naći brojni kornjaši *Gyrophana boleti*, iz porodice kusokrilca (*Staphylinidae*), te da je nađeno više od 400 kornjaša na jednom sporokarpu (Slika 15). Poznato je da približno 25 vrsta kukaca polaže jaja i razvija svoju larvalnu fazu u plodnom tijelu *F. pinicola* (Jonsell i sur., 2001).

Osim toga, u istraživanju provedenom u jugoistočnoj Švedskoj 2011. godine, Persson i sur. su u visokim panjevima različite starosti, na potkornjacima i u njihovim galerijama utvrdili prisutnost gljive *Fomitopsis pinicola*. Autori su uzorkovali potkornjake, micelij i drvo iz blizine galerija šestozubog smrekinog potkornjaka (*Pityogenes chalcographus*) i potkornjaka iz roda *Crypturgus* u kori obične smreke (*Picea abies*). U panjevima starim 1 godinu dominirali su kvasci i nije bilo aktivnosti potkornjaka, a u panjevima starim 2 i 3 godine najviše su bile prisutne askomicete i uobičajene bazidiomicete truležnice drva (*Fomitopsis pinicola*, *Phlebiopsis gigantea*, *Stereum sanguinolentum*, i *Trichaptum abietinum*), kao miceliji povezani sa galerijama kukaca i na potkornjacima. Vrsta *F. pinicola* najčešće je nađena na panjevima starim 2 godine, no nije je bilo na panjevima starim 3 godine. Rezultati su pokazali da potkornjaci olakšavaju širenje gljive prenoseći hife na svom tijelu kad se pomaknu sa

zaraženog stabla, ali nisu simbiotski ovisni o samoj gljivi. Lunde i sur (2023) utvrdili su da potkornjaci nose spore u svježe trupce smreke na egzoskeletu, ali ne i u izmetu, te da se potkornjaci ne hrane sporama već ih pasivno dobivaju iz okoliša dok žive u blizini sporokarpa *F. pinicola* ili komadima mrtvog drva koja su žarišta potkornjaka i ove gljive truležnice. Najčešće noću posjećuju sporokarpe *F. pinicola*, jer ih privlače hlapljive tvari koji se iz njih emitiraju.

Shodno navedenom, moglo bi se zaključiti kako i *T. oxyurus* prvenstveno ima ulogu u širenju spora gljive *F. pinicola* na stabla jele, i kako se najvjerojatnije ne radi o obligatnom simbiotskom odnosu, iako bi za konačnu potvrdu trebalo provesti analizu izmeta ličinki i adulta. Također, moguće je da je ova truležnica u stablima jele prisutna i prije dolaska potkornjaka, s obzirom da on prvenstveno kolonizira stabla oslabljenog vitaliteta i odumiruća ili mrtva stabla, koja su ujedno i jako podložna napadu gljiva truležnica neovisno o kolonizaciji potkornjacima.



Slika 15. Ličinke *G. boleti* na sporokarpu gljive *F. pinicola* (foto: M. Bellifa, 2017).

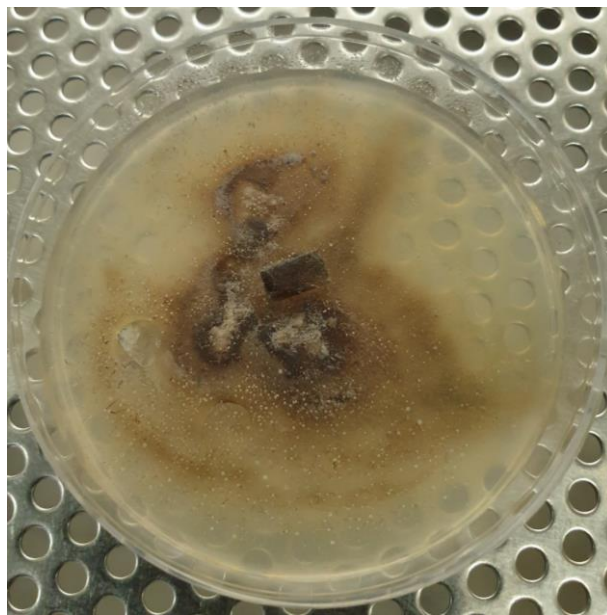
Sedam čistih kultura micelija (Slika 16) je identificirano kao vrsta *Graphilbum fragrans*, iz reda *Ophiostomatales* i odjela *Ascomycota*. Sve vrste roda *Graphilbum* međusobno su slične morfologije i većinom aseksualne (Žgela, 2021), a zajedno s vrstama roda *Ophiostoma* najčešće su povezane sa kornjašima koji napadaju jele. Vrsta *G. fragrans* često je izolirana iz potkornjaka koji napadaju četinjače u Europi (Jankowiak i sur., 2017). Na primjer, ambrozija kukac *Trypodendron lineatum* i jelin krivozubi potkornjak (*Pityokteines curvidens*) često su vezani s *G. fragrans* i vrstama *Ophiostoma* (Jankowiak i sur., 2017). Wang i sur. (2019) proveli su istraživanje o diferencijalnim obrascima ofiostomatoidnih gljivičnih zajednica povezanih s tri vrste borovih potkornjaka iz roda *Tomicus* u kojem navode da je *G. fragrans* povezana s malim borovim potkornjakom (*Tomicus minor*). Shodno navedenome, moguće je da je ova gljiva simbiotski povezana i sa jelinim valjkastim srčikarom.



Slika 16. Izolat 3.10 – *Graphilbum fragrans*.

Dva izolata (Slika 17) su identificirana kao vrsta *Sugiyamaella chiloensis* iz reda *Saccharomycetales* i porodice *Trichomonascaceae*. Rod *Sugiyamaella* blisko je povezan s rodovima *Trichomonascus*, *Wickerhamiella* i *Zygoascus* na temelju filogenetskih analiza LSU, MtSm i COXII nukleotidnih sekvenci (Kurtzman i Robnett, 2007; Péter i sur., 2012). Pronađena je u Europi, i Sjevernoj i Južnoj Americi. Kurtzman (2011) je prihvatio četiri vrste u rod *Sugiyamaella* i predložio ključ za ovaj rod, uglavnom temeljen na reakcijama na standardnim testovima rasta i fermentacije. Do 2021. godine bilo je opisano 29 vrsta od kojih

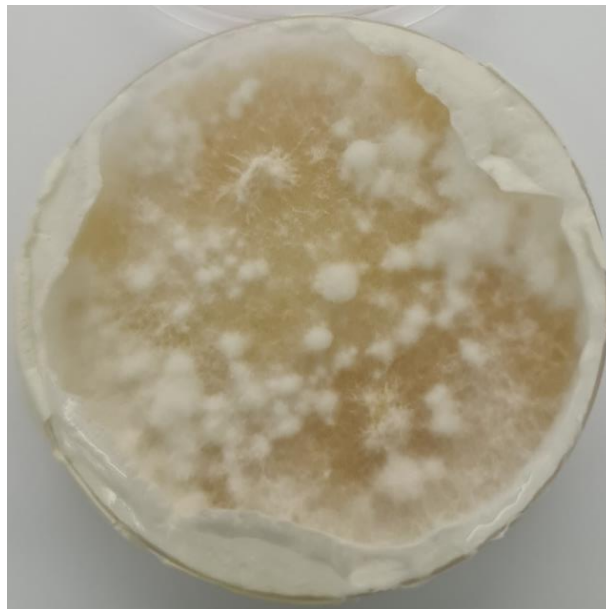
su 4 imala poznata savršena stadija: *S. americana*, *S. chiloensis*, *S. japonica*, i *S. smithiae*. Vrste roda *Sugiyamaella* često su povezane s kukcima. Nađene su u staništima kukaca, trulom drvu, šumskom tlu, tresetu, ili na samim tijelima kukaca (Shi i sur., 2021). U istraživanju crijeva saproksilnih kornjaša iz porodice *Passalidae*, Urbina i sur. (2013) navode da postoji nekoliko različitih vrsta kvasaca koji su često povezani s kornjašima. Probavni je sustav saproksilnih kukaca mikrostanište za specijaliziranu zajednicu mikroorganizama (bakterije, nematode, gljive, itd.). Njihova crijeva bogata su askomicetnim kvascima, pogotovo onim koji fermentiraju ksilozu. Ksiloza je monosaharid, poznat kao drveni šećer, nalazi se u biljnom materijalu kao osnovni dio hemiceluloze. Kvasci povezani s vrstama roda *Passalidae* su *Sugiyamaella*, *Scheffersomyces*, i *Spathaspora*. Vrste *Sugiyamaella* su kvasci koji asimiliraju ksilozu, a članovi rodova *Scheffersomyces* i *Spathaspora* fermentiraju D-ksilozu (Urbina, 2013).



Slika 17. Uzorak 04 – *Sugiyamaella chiloensis*.

Budući da su vrste *Sugiyamaella* često izolirane iz staništa kukaca i trulog drva, možemo zaključiti da žive u simbiozi sa kukcima. Osim što jelin valjkasti srčikar i drugi kornjaši prilikom stvaranja otvora u deblu u kojima buše hodnike, kvascima i drugim gljivama olakšavaju put u unutrašnjost stabla, kornjaši iskorištavaju sposobnost vrsta *Sugiyamaella* da razgrađuju hemicelulozu.

Osam čistih kultura micelija je identificirano kao vrsta *Saprochaete fungicola* (Slika 18), anamorfni kvasac koji se razmnožava fragmentacijom hifa u nespodne spore nazvane artrokonidije. Te spore olakšavaju rasprostranjivanje, a kod patogenih gljiva pridonose virulenciji (Brejová i sur., 2019). Utvrđeno je da *Magnusiomyces* predstavlja teleomorfno stanje *Saprochaete* u spolnom razmnožavanju. Nekoliko vrsta *Saprochaete* proizvode nevjerojatno velike taluse, nalik na alge, koje su striktno hifalne i ne stvaraju pupajuće stanice. Većina vrsta samo je rijetko bila izolirana, pa je stoga teško utvrditi bilo kakve ekološke trendove za pojedinu vrstu (de Hoog i sur., 2011), a ujedno i donositi bilo kakve zaključke vezano uz ulogu ovoga kvasca u biologiji jelinog valjkastog srčikara.



Slika 18. Izolat 023 – *Saprochaete fungicola*.

Penicillium je rod askomicetnih gljiva, sa više od 350 različitih vrsta. Vrste ovog roda su sveprisutne gdje god je dostupan organski materijal. Poznate su kao plijesni, glavni uzročnici kvarenja hrane (Park, 2019). Njihov micelij sastoji se od razgranatih mreža bezbojnih hifa. Konidiofori na kraju svake grane nose kuglaste konidije. U ovom istraživanju je jedan izolat identificiran kao *Penicillium* sp. (Slika 19), odnosno kao *P. thommi* ili *P. lanosum*, sa podudarnošću većom od 99,24%, ali ne možemo sa sigurnošću utvrditi o kojoj se od ove dvije vrste radi.

Budući da se plijesni nalaze u svim okruženjima i imaju važnu ulogu kao razlagači, za očekivati je da će biti izolirane iz hodnika ili sa tijela jelinog valjkastog srčikara koji svoje hodnike buše u stablima oslabljenog vitaliteta koja se više ne mogu braniti od napada gljiva truležnica i plijesni. Stoga možemo zaključiti da vrste *Penicillium* spp. najvjerojatnije nisu u simbiozi sa vrstom *Treptoplastypus oxyurus*.



Slika 19. Izolat 3.5 – *Penicillium* sp.

6. ZAKLJUČAK

Jelin valjkasti srčikar, *Treptoplatypus oxyurus*, je jedan od dvije vrste iz potporodice srčikara (*Platypodinae*) koje obitavaju u Europi. U Hrvatskoj je otkriven 2011. godine te je od tada utvrđen na područjima nacionalnih parkova Plitvička jezera, Risnjak i Velebit, u kojima su šume zadržale prašumski karakter. Vrste ove potporodice su ksilomicetofagi, tj. hrane se drvom i micelijima gljiva koje se razvijaju u njihovim galerijskim sustavima. S nekim gljivama koje se pojavljuju u hodnicima žive u simbiozi i cilj ovog rada bio je identificirati te gljive do razine vrste. Ovakva simbioza između kukca i gljive moguća je zbog posebnih organa na tijelu kukca tzv. mikangija, u kojima prenose spore i hife gljiva u svoje stanište.

Izolacijom DNK i lančanom reakcijom polimeraze utvrđena je potencijalna zajednica gljiva u galerijama jelinog valjkastog srčikara. Identifikacija se vršila pomoću umnožavanja tri regije DNK (ITS, LSU, TUB) u PCR reakciji. Najuspješnija regija bila je LSU, sa 37 izolata identificiranih kao pet vrsta s podudarnošću sekvence većom od 98 %: crvenorubna guba *Fomitopsis pinicola*, ofiostomatoidna gljiva *Graphilbum fragrans*, kvasci *Meyerozyma guilliermondii* i *Saprochaete fungicola*, i vrsta srodna kvascima *Sugiyamaella chiloensis*. Također je identificirana plijesan iz roda *Penicillium* (jedan izolat) pomoću LSU i TUB regije.

Među identificiranim vrstama, isticao se kvasac *Meyerozyma guilliermondi*, gljiva *Graphilbum fragrans* te vrsta srodna kvascima *Sugiyamaella chiloensis*, jer su u ovome istraživanju identificirane u velikom broju, a u sličnim istraživanjima provedenim u svijetu su potvrđene kao simbioti „ambrozija“ potkornjaka. Iako su potrebna dodatna istraživanja za konačnu potvrdu, može se sa visokom vjerojatnošću pretpostaviti kako je kvasac *Meyerozyma guilliermondi*, jelinom valjkastom srčikaru koristan za uspješnu kolonizaciju jele, zbog njegove dokazane enzimatske sposobnosti. Ofiostomatoidna gljiva *Graphilbum fragrans* često je povezana sa kornjašima kao što su ambrozija kukac *Trypodendron lineatum* i jelin krivozubi potkornjak (*Pityokteines curvidens*), a nedavno je otkrivena njena povezanost s malim borovim potkornjakom (*Tomicus minor*). Zbog tendencije gljive *Graphilbum fragrans* za udruživanje u simbiotski život sa kornjašima koji napadaju jelu, moguće je da je ova gljiva simbiotski povezana i sa jelinim valjkastim srčikarom. Također, *Sugiyamaella chiloensis* je zbog svoje sposobnosti asimilacije ksiloze vrlo često nađena u staništima kornjaša, između ostalih i jelinog valjkastog srčikara.

Iako je crvenorubna guba (*Fomitopsis pinicola*) također često identificirana u ovome istraživanju, te u sličnim istraživanjima izolirana s tijela različitih kornjaša, s obzirom na njenu poznatu biologiju je vjerojatnije da nije simbiot „ambrozija“ potkornjacima već da su oni samo vektori za širenje spora gljive na nova stabla jele, iako bi to trebalo potvrditi analizom izmeta ili crijevnog sadržaja ličinki i adulta.

Što se tiče ostalih identificiranih vrsta, kvasac *Saprochaete fungicola* je nedovoljno istražen, stoga nije moguće donositi zaključke o potencijalnom simbiotskom životu sa jelinim valjkastim srčikarom, a vrste plijesni iz roda *Penicillium* su sveprisutne i imaju važnu ekološku ulogu kao razlagači, stoga je za očekivati da će biti izolirane sa tijela jelinog valjkastog srčikara ili iz njihovih hodnika. Iako se njihova staništa preklapaju, njihov suživot najvjerojatnije nije simbiotskog karaktera.

Istraživanjem je dobiven jedan dodatan uvid u gljive prisutne u hodničnom sustavu jelinog valjkastog srčikara, ali je svakako neophodno nastaviti analize prisutnih gljiva na dodatnom broju uzoraka galerija, te proširiti istraživanje i na analize crijeva te izmeta potkornjaka kako bi se potvrdilo kojim gljivama i kvascima se oni zaista i hrane. U obzir svakako treba uzeti i sezonalnost pojave nekih vrsta gljiva te analize vršiti kroz čitavu godinu.

7. LITERATURA

- 1) Alamouti S. M., Clement K.M. Tsui, Breuil C.(2009), *Multigene phylogeny of filamentous ambrosia fungi associated with ambrosia and bark beetles*, Mycological Research, Volume 113, Issue 8, Pages 822-835.
- 2) Alsohaili, Sohail A., and Bayan M. Bani-Hasan. (2018) "*Morphological and molecular identification of fungi isolated from different environmental sources in the Northern Eastern desert of Jordan.*" Jordan Journal of Biological Sciences 11.3.
- 3) Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J., (1990): *Basic local alignment search tool*. Journal of Molecular Biology 215 (3): 403-10.
- 4) Batra LR (1966) *Ambrosia fungi: extent of specificity to ambrosia beetles*. Science 153:193–195. <https://doi.org/10.1126/science.153.3732.193>
- 5) Batra LR (1967) *Ambrosia fungi: a taxonomic revision, and nutritional studies of some species*. Mycologia 59:976–1017. <https://doi.org/10.1080/00275514.1967.12018485>
- 6) Bishop K.S. (2020) *Characterisation of Extracts and Anti-Cancer Activities of Fomitopsis pinicola*. Nutrients. 2020 Feb 26;12(3):609. doi: 10.3390/nu12030609. PMID: 32110892; PMCID: PMC7146440.
- 7) Brejová B., Lichancová H., Hodorová V., Neboháčová M., Tomáška L., Vinarš T., Nosek J. (2019). *Genome sequence of an arthroconidial yeast, Saprochaete fungicola CBS 625.85*. Microbiol Resour Announc 8:e00092-19
- 8) De Rijk P, Wuyts J, Van de Peer Y, Winkelmans T, De Wachter R. *The European large subunit ribosomal RNA database*. Nucleic Acids Res. 2000 Jan 1;28(1):177-8. doi: 10.1093/nar/28.1.177. PMID: 10592218; PMCID: PMC102430.
- 9) Lunde L.F., Boddy L., Sverdrup-Thygeson A., Jacobsen R.M., Kauserud H., Birkemoe T., (2023) *Beetles provide directed dispersal of viable spores of a keystone wood decay fungus*, Fungal Ecology, Volume 63, 101232, ISSN 1754-5048, <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2023.101232>.
- 10) Glass, N.L. and Donaldson, G.C. (1995) *Development of Primer Sets Designed for Use with the PCR to amplify Conserved Genes from Filamentous Ascomycetes*. Applied and Environmental Microbiology, 61, 1323-1330.
- 11) G. Sybren de Hoog, Maudy Th. Smith (2011), *Chapter 97 - Saprochaete Coker & Shanor ex D.T.S. Wagner & Dawes (1970)*, Editor(s): Cletus P. Kurtzman, Jack W. Fell, Teun

- Boekhout, The Yeasts (Fifth Edition), Elsevier, Pages 1317-1327, ISBN 9780444521491, <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00097-5>
- 12) Gogola, E., (1986): Jadrohlod jedľový (*Platypus oxyurus* Duf.), nový drevokazný škodca jedle na Slovensku. Lesnický časopis, god. 32, br. 1, 17–24.
 - 13) Hågvar, S. (2018) *Contribution to the ecology of Gyrophaena boleti (Linnaeus, 1758) (Coleoptera, Staphylinidae) breeding in the pore layer of the fungus Fomitopsis pinicola (Fr.) Karst.* Norwegian Journal of Entomology 65, 108–114.
 - 14) Kostovcik M., Bateman C.C., Kolarik M., Stelinski L.L., Jordal B.H., Hulcr J. (2014) *The ambrosia symbiosis is specific in some species and promiscuous in others: evidence from community pyrosequencing.* ISME J. 2015 Jan;9(1):126-38. doi: 10.1038/ismej.2014.115. Epub 2014 Aug 1. PMID: 25083930; PMCID: PMC4274425.
 - 15) Jankowiak, R., Strzałka, B., Bilański, P. et al. (2017) *Diversity of Ophiostomatales species associated with conifer-infesting beetles in the Western Carpathians.* Eur J Forest Res 136, 939–956 <https://doi.org/10.1007/s10342-017-1081-0>
 - 16) Jonsell, M., Nordlander, G., & Ehnström, B. (2001). *Substrate associations of insects breeding in fruiting bodies of wood-decaying fungi.* Ecological Bulletins, 173-194.
 - 17) Krcivoj, T. (2021). *Hodnični sustav i razvojni ciklus jelinog valjkastog srčikara, Treptoplatypus oxyurus (Dufour, 1843)* (Diplomski rad). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Fakultet šumarstva i drvne tehnologije. Preuzeto s <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:108:148863>
 - 18) Kundu, K., Banerjee, P.S., Garg, R. et al. *Cloning and sequencing of beta-tubulin and internal transcribed spacer-2 (ITS-2) of Eimeria tenella isolate from India.* J Parasit Dis 39, 539–544 (2015). <https://doi.org/10.1007/s12639-013-0392-4>
 - 19) Kurtzman CP. (2007) *Eleven new species of Sugiyamaella and Candida from forest habitats.* FEMS Yeast Res. 2007 Sep;7(6):1046-63. doi: 10.1111/j.1567-1364.2007.00224.x. Epub 2007 Mar 16. PMID: 17367512.
 - 20) Kurtzman CP (2011) Sugiyamaella Kurtzman & Robnett (2007). In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T (Eds) *The Yeasts – a Taxonomic Study* (5th edn, Vol. 2). Elsevier, Amsterdam, 817–822. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00072-0>
 - 21) Kurtzman CP, Robnett CJ (2007) *Multigene phylogenetic analysis of the Trichomonascus, Wickerhamiella and Zygoascus yeast clades, and the proposal of Sugiyamaella gen. nov. and 14 new species combinations.* FEMS Yeast Research 7: 141–151. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00157>

- 22) Lehenberger M., Benkert M. and Biedermann P.H.W. (2021): *Ethanol-Enriched Substrate Facilitates Ambrosia Beetle Fungi, but Inhibits Their Pathogens and Fungal Symbionts of Bark Beetles*. *Front. Microbiol.* 11:590111. doi: 10.3389/fmicb.2020.590111
- 23) Miller M.W.m Phaff H.J. (1962) *Successive Microbial Populations in Calimyrna Figs*, Journal Article, *Applied Microbiology* Vol.10, No.5, 394-400, <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/am.10.5.394-400.1962>
- 24) Nel, W.J., Wingfield, M.J., de Beer, Z.W. et al. (2021) *Ophiostomatalean fungi associated with wood boring beetles in South Africa including two new species*. *Antonie van Leeuwenhoek* 114, 667–686. <https://doi.org/10.1007/s10482-021-01548-0> .
- 25) Nivedita Sharma, Nisha Sharma, Shakshi Sharma, Pushpinder Sharma, Bindu Devi, Chapter 3 - *Identification, morphological, biochemical, and genetic characterization of microorganisms, Basic Biotechniques for Bioprocess and Bioentrepreneurship*, Academic Press, 2023, Pages 47-84, ISBN 9780128161098, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816109-8.00003-9> .
- 26) O'Donnell, K. and Cigelnik, E. (1997) *Two Divergent Intragenomic rDNA ITS2 Types within a Monophyletic Lineage of the Fungus Fusarium Are Nonorthologous*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7, 103. <https://doi.org/10.1006/mpev.1996.0376>
- 27) Park, M.S., Oh, S.Y., Fong, J.J. et al. The diversity and ecological roles of *Penicillium* in intertidal zones. *Sci Rep* 9, 13540 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49966-5>
- 28) Péter G, Dlačny D, Price NPJ, Kurtzman CP (2012) *Diddensiella caesifluorescens* gen. nov., sp. nov., a riboflavin-producing yeast species of the family Trichomonascaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62: 3081–3087. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.042895-0>
- 29) Persson Y., Ihrmark K., Stenlid J., (2011) *Do bark beetles facilitate the establishment of rot fungi in Norway spruce?*, *Fungal Ecology*, Volume 4, Issue 4, 2011, Pages 262-269, ISSN 1754-5048, <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2011.01.005>.
- 30) SEIFERT, K.A. (2009), *Progress towards DNA barcoding of fungi*. *Molecular Ecology Resources*, 9: 83-89. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02635.x>
- 31) Shi CF, Zhang KH, Chai CY, Yan ZL, Hui FL. (2021) *Diversity of the genus Sugiyamaella and description of two new species from rotting wood in China*. *MycKeys*. 2021 Jan 12;77:27-39. doi: 10.3897/mycokeys.77.60077. PMID: 33519267; PMCID: PMC7815693.
- 32) Sibirny, A.A., Boretsky, Y.R. (2009). *Pichia guilliermondii* . In: Satyanarayana, T., Kunze, G. (eds) *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8292-4_6

- 33) Šimunović, N. (2012). *Platyypus oxyurus* na Sjevernom Velebitu (Završni rad). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Fakultet šumarstva i drvene tehnologije. Preuzeto s <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:108:488417>
- 34) Trupković, R. (2018). *Nove metode sekvenciranja DNA* (Završni rad). Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju. Preuzeto s <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:829180>
- 35) Urbina, H., Frank, R., & Blackwell, M. (2013). *Scheffersomyces cryptocercus: a new xylose-fermenting yeast associated with the gut of wood roaches and new combinations in the Sugiyamaella yeast clade*. Mycologia, 105(3), 650–660. <https://doi.org/10.3852/12-094>
- 36) Wang HM, Wang Z, Liu F, Wu CX, Zhang SF, Kong XB, Decock C, Lu Q, Zhang Z (2019): *Differential patterns of ophiostomatoid fungal communities associated with three sympatric Tomigus species infesting pines in south-western China, with a description of four new species*. MycoKeys 50: 93-133. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.50.32653>
- 37) White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. W., (1990): *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. PCR protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press Inc., New York, USA, 315-322.
- 38) Yun Y.H., Suh D.Y., Yoo H.D., Oh M.H., Kim S.H. (2015) *Yeast Associated with the Ambrosia Beetle, Platypus koryoensis, the Pest of Oak Trees in Korea*. Mycobiology. 43(4):458-66. doi: 10.5941/MYCO.2015.43.4.458. Epub 2015 Dec 31. PMID: 26839506; PMCID: PMC4731651.
- 39) Žarković, I.; Đuka, A.; Franjević, M.; Tomljanović, K.; Papa, I.; Krcivoj, T.; Hrašovec, B. *Rare European Beetle Treptoplatypus oxyurus (Coleoptera: Platypodidae) in Managed Uneven-Aged Forests of Croatia*. Forests 2022, 13, 580. <https://doi.org/10.3390/f13040580>
- 40) Žgela, L. (2021). *Zajednica gljiva u hodničnom sustavu jelinog valjkastog srčikara, Treptoplatypus oxyurus (Dufour, 1843)* (Diplomski rad). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Fakultet šumarstva i drvene tehnologije. Preuzeto s <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:108:246426>

Internet izvori:

- 41) <http://symbioticworld.weebly.com/ambrosia-beetles-and-fungi.html>
- 42) <https://ambrosiasymbiosis.org/ambrosia-fungi/who-are-the-fungi/>
- 43) https://bs.wikipedia.org/wiki/Sangerovsko_sekvenciranje
- 44) https://hmn.wiki/hr/DNA_barcode
- 45) [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology_\(Boundless\)/07%3A_Microbial_Genetics/7.13%3A_Bioinformatics/7.13F%3A_DNA_Sequencing_Based_on_Sanger_Dideoxynucleotides](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology_(Boundless)/07%3A_Microbial_Genetics/7.13%3A_Bioinformatics/7.13F%3A_DNA_Sequencing_Based_on_Sanger_Dideoxynucleotides)
- 46) <https://www.wikidoc.org/index.php/Pichia>
- 47) https://en.wikipedia.org/wiki/LSU_rRNA