Status patogene gljive Cryphonectria parasitica (Murrill) M.E. Barr na hrastu kitnjaku (Quercus petraea (Matt.) Liebl.) u klonskoj sjemenskoj plantaži Novoselci (UŠP Požega)

Majnarić, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Forestry / Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:108:355201

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

University of Zagreb Faculty of Forestry and Wood Technology

ŠUMARSKI FAKULTET SVEUČILIŠTA U ZAGREBU

ŠUMARSKI ODSJEK

SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

URBANO ŠUMARSTVO, ZAŠTITA PRIRODE I OKOLIŠA

MARIJA MAJNARIĆ

STATUS PATOGENE GLJIVE *Cryphonectria parasitica* (MURRILL) M.E. BARR NA HRASTU KITNJAKU (*Quercus petraea* (MATT.) LIEBL.) U KLONSKOJ SJEMENSKOJ PLANTAŽI NOVOSELCI (UŠP POŽEGA)

DIPLOMSKI RAD

ZAGREB, 2020.

ŠUMARSKI FAKULTET SVEUČILIŠTA U ZAGREBU

ŠUMARSKI ODSJEK

STATUS PATOGENE GLJIVE *Cryphonectria parasitica* (MURRILL) M.E. BARR NA HRASTU KITNJAKU (*Quercus petraea* (MATT.) LIEBL.) U KLONSKOJ SJEMENSKOJ PLANTAŽI NOVOSELCI (UŠP POŽEGA)

DIPLOMSKI RAD

Diplomski studij: Urbano šumarstvo, zaštita prirode i okoliša

Predmet: Integrirana zaštita šuma u zaštićenim područjima

Ispitno povjerenstvo:

1. Prof. dr. sc. Danko Diminić
2. Doc. dr. sc. Milivoj Franjević
3. Dr. sc. Jelena Kranjec Orlović

Studentica: Marija Majnarić

JMBAG: 0068220988

Broj indeksa: 947/18

Datum odobrenja teme: 17.4.2020.

Datum predaje rada: 14.9.2020.

Datum obrane rada: 25.9.2020.

Zagreb, rujan 2020.

Dokumentacijska kartica

Naslov	Status patogene gljive *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M.E. Barr na hrastu kitnjaku (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.) u klonskoj sjemenskoj plantaži Novoselci (UŠP Požega)
Title	The status of pathogenic fungus *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M.E. Barr on *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. in clonal seed orchard Novoselci (FA Požega)
Autor	Marija Majnarić
Adresa autora	Siget 9, Zagreb
Mjesto izrade	Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Vrsta objave	Diplomski rad
Mentor	prof. dr. sc. Danko Diminić
Komentorica	dr. sc. Jelena Kranjec Orlović
Izradu rada pomogao	dr. sc. Jelena Kranjec Orlović
Godina objave	2020.
Obujam	34 stranice, 13 slika, 3 tablice, 41 navoda literature
Ključne riječi	hrast kitnjak, sjemenska plantaža, *Cryphonectria parasitica*, UŠP Novoselci
Key words	sessile oak, seed orchard, chestnut blight, FA Požega
Sažetak	U KSP hrasta kitnjaka Novoselci je tijekom 2018. godine uočena prisutnost patogene gljive *Cryphonectria parasitica*. Cilj ovog istraživanja je utvrditi broj i zdravstveno stanje zaraženih klonova u 2020. g., te izolirati patogena iz simptomatičnog tkiva kore, kako bi se dobivene kulture micelija mogle na temelju morfoloških karakteristika grupirati u hipovirulentne, virulentne i prijelazne tipove. Također će biti predložene moguće mjere zaštite na temelju utvrđenog stanja i pregleda dostupne literature.

	IZJAVA O IZVORNOSTI RADA	**OB ŠF 05 07**
		Revizija: 1
		Datum: 28.6.2017.

„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“.

_____

Marija Majnarić

U Zagrebu, *25. rujna 2020.*

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1 Hrast kitnjak (Quercus petraea (Matt.) Liebl.) u Republici Hrvatskoj 1

1.2. *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M.E. Barr i pojavnost na hrastu 3

1.3. Hipovirulentnost i biološka kontrola 6

1.4. Klonske sjemenske plantaže 8

2. CILJ RADA 10

3. MATERIJALI I METODE 11

3.1. Područje istraživanja 11

3.2. Uzorkovanje na terenu 13

3.3. Izolacija micelija gljive 16

3.4. Presadnja i dobivanje čistih kultura 18

3.5. Identifikacija čistih kultura i morfologija 19

4. REZULTATI 20

5. RASPRAVA 25

6. ZAKLJUČAK 31

7. LITERATURA 32

Popis slika

Slika 1. Areal hrasta kitnjaka

Slika 2. Klonska sjemenska plantaža Novoselci

Slika 3. Položaj klonske sjemenske plantaže Novoselci

Slika 4. Raspored uzorkovanih klonova na lijevoj strani klonske sjemenske plantaže Novoselci

Slika 5. Raspored uzorkovanih klonova na desnoj strani klonske sjemenske plantaže Novoselci

Slika 6. Uzorak kore (lijevo) i uzorak segmenta grane (desno) s vidljivim stromama gljive *Cryphonectria parasitica*

Slika 7. Vitičasti nizovi konidija tzv. roščići koji izlaze iz piknida (nespolnih plodišta) gljive *Cryphonectria parasitica*

Slika 8. Dijelovi biljnog i gljivičnog tkiva postavljeni na hranjivu podlogu

Slika 9. Prikaz presađenog rubnog dijela micelija gljive *Cryphonectria parasitica*

Slika 10. Udio pojedinog soja gljive *Cryphonectria parasitica* na uzorkovanim stablima hrasta kitnjaka

Slika 11. Virulentni soj gljive *Cryphonectria parasitica*

Slika 12. Prijelazni soj gljive *Cryphonectria parasitica*

Slika 13. Hipovirulentni soj gljive *Cryphonectria parasitica*

Popis tablica

Tablica 1. Broj ramete/klona i prikupljenih uzoraka biljnog tkiva

Tablica 2. Uzorci sa stromama/piknidama

Tablica 3. Broj i pripadajući soj dobivenih kultura micelija po pojedinom uzorku

PREDGOVOR

Veliku zahvalnost u prvom redu dugujem mentoru prof. dr. sc. Danku Diminiću na ukazanom povjerenju te dr. sc. Jeleni Kranjec Orlović na trudu, neumornoj i stručnoj pomoći pri izradi rada.

Također želim se zahvaliti djelatnicima šumarije Požega, Ljiljani Fliszar, dipl. ing. šum., Nadi Šarić, dipl. ing. šum. i Ivici Tomiću na srdačnom gostoprimstvu i pomoći oko svih informacija potrebnih pri izradi ovoga rada.

Veliko hvala dugujem svim prijateljima i kolegama koji su bili uz mene tijekom ovog studija, dijeleći lijepe i teške trenutke.

Najveću zahvalnost želim izraziti svojoj obitelji koja mi je omogućila školovanje, te neumorno davala podršku i bila uz mene tijekom cijelog studija.

1. UVOD

1.1 Hrast kitnjak (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.) u Republici Hrvatskoj

Hrast kitnjak zajedno s hrastom lužnjakom i običnom bukvom spada u najznačajnije gospodarske i ekološke vrste šumskog drveća na području Republike Hrvatske. Listopadna je vrsta koja pripada porodici *Fagaceae*. Habitus karakterizira plitko uzdužno raspucana kora debljine 2 cm te gusta i razgranata krošnja. Može narasti do 40 m visine. Raste na kiselom, podzolastom i slabo razvijenom skeletnom tlu nizinskih, a naročito brežuljkastih i brdskih terena (Franjić i Škvorc, 2010).

U Hrvatskoj hrast kitnjak predstavlja glavnu vrstu drveća brežuljkastog pojasa. Taj se pojas na nadmorskoj visini od približno 120 – 150 metara prislanja uz nizinski pojas u kojemu prevladavaju šume hrasta lužnjaka. Na nadmorskoj visini od približno 400 – 500 metara, pojas kitnjakovih šuma graniči s brdskim pojasom, gdje prevladavaju šume obične bukve. Ovom pojasu pripadaju brežuljci i donji dijelovi panonskog gorja (Medvednica, Ivanščica, Kalnik, slavonsko gorje). Brežuljkasti pojas razvijen je također u Banovini te južno od Karlovca i u smjeru Severina na Kupi, te u smjeru Josipdola, na rubu ličke visoravni i u Istri (Anon., 2017).

Generalno gledano, areal hrasta kitnjaka (Slika 1) obuhvaća područje Europe, Kavkaza i Male Azije (Franjić i Škvorc, 2010).



Slika 1. Areal hrasta kitnjaka (EUFORGEN, 2008)

Kitnjakove sastojine su najčešće mješovite i razvijaju se iznad dohvata poplavnih voda. U omjeru smjese uz hrast kitnjak pridolaze obična bukva, obični grab, pitomi kesten, obična breza, divlja trešnja, klen, divlja kruška, crni jasen, mukinja, jarebika i lipe. Udio navedenih vrsta mijenja se s uvjetima staništa, nadmorskom visinom, ekspozicijom, nagibom i šumskouzgojnim postupcima (Anon., 2017).

Vezano uz zdravstveno stanje hrasta kitnjaka primjećuju se promjene koje korespondiraju s unošenjem stranih invazivnih vrsta flore i faune. Okolišne karakteristike staništa također su izložene promjenama koje se povezuju s općom globalnom promjenom klime. Prema izvješću oštećenosti šumskih ekosustava RH (Potočić i sur., 2020) za razdoblje od 2009.- 2019. godine, zabilježene su oscilacije u osutosti hrasta kitnjaka ovisno o sušnim godinama. Pa je tako prema posljednjim podacima značajna osutost hrasta kitnjaka u 2019. godini bila nešto veća u odnosu na 2018. godinu (sa 41,12 % u 2018. na 45,73 % u 2019. godini).

Uz suptilne promjene staništa najizraženiju opasnost u posljednjih nekoliko godina predstavljaju kukci i biljni patogeni. Među najvažnije štetne biotske čimbenike hrasta kitnjaka ubrajaju se hrastova pepelnica i hrastova mrežasta stjenica.

Hrastova pepelnica (*Microsphaera alphitoides*) prisutna je na području RH više od stotinjak godina na svim vrstama hrasta. Zbog širokog obujma domaćina i stalne rasprostranjenosti na velikim površinama hrastovih šuma, tretira se brojnim fungicidima (Glavaš, 2011). Obligatni je parazit koji je prepoznatljiv po pepeljastim prevlakama odnosno vegetativnom tijelu koje razvija na površini lista. Šteta nastaje najviše na biljkama koje su izložene suncu a to su: biljke u rasadnicima, čiste sječine, progale i rubovi sastojina. Prvi se simptomi uočavaju u svibnju na mladim listovima kada je napad pepelnice slabijeg intenziteta i ne uzrokuje veće štete. U slučaju golobrsta bolest je toliko jaka da se mladi list, koji je odmah zaražen, ne stigne razviti već, ga pepelnica uništi i on brzo otpadne. Kao posljedica crpljenja hranjiva i smanjenje asimilacije hrast zaostaje u rastu, fiziološki slabi, te je podložan napadu sekundarnih kukaca i gljiva (Glavaš, 1999).

Hrastova mrežasta stjenica (*Corythucha arcuata*) je invazivni štetnik koji je u Hrvatskoj potvrđen 2013. godine na području istočne Hrvatske, točnije na području spačvanskih šuma hrasta lužnjaka (Hrašovec i sur., 2013). Od tada se značajno proširila unutar 14 županija istočne, sjeverozapadne i središnje Hrvatske. Smatra se primarnim štetnikom

hrasta lužnjaka i hrasta kitnjaka iako je zamijećena i na drugim vrstama: divlja jabuka (*Malus sylvestris* (L.) Mill.), nizinski brijest (*Ulmus minor* Mill.), kupine (*Rubus* spp.) (NN 52 / 2017). Najveća folijarna oštećenja nastaju početkom lipnja nakon izlijeganja ličinki koje se intenzivno hrane s donje strane lista uzrokujući promjenu boje i uništavanje tkiva lišća što dovodi do sušenja i preranog otpadanja (Franjević i sur., 2018). Prema novijim procjenama štete od *C. arcuata* mogle bi povećati fiziološku osjetljivost stabala na napade drugih štetnih kukaca i bolesti, a nije isključen i povećani aditivni utjecaj polutanata (Rabitsch, 2008).

Na hrastu kitnjaku se uz navedene štetne biotske čimbenike može ubrojiti i potencijalno opasna patogena gljiva *Cryphonectria parasitica* koja do sada nije u velikoj mjeri zabilježena na stablima u RH.

1.2. *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M.E. Barr i pojavnost na hrastovima (*Quercus* spp.)

Cryphonectria parasitica je askomicetna gljiva koja pripada razredu *Sordariomycetes* te redu *Diaporthales* (Hibbet i sur., 2007). Gljiva je agresivnog karaktera te uzrokuje rak kore kestena (*Castanea* spp.) i ostalih osjetljivih rodova i vrsta (uglavnom *Quercus* spp.) (EPPO, 2005).

Izvorno potječe iz istočne Azije i Japana. Na azijskim je vrstama kestena slab patogen i vjeruje se da se između njih kroz filogeniju uspostavila određena ravnoteža. Početkom 20. stoljeća slučajno se proširila u SAD. Kako američki kesten u svome razvoju nije razvio gene otpornosti na *C. parasitica*, a za nju je povoljan domaćin, gljiva ga je žestoko napadala i brzo se širila po cijelom arealu u Sjevernoj Americi (Glavaš, 1999). U Europi je bolest prvi put zapažena 1938. godine u Italiji (Genova), odakle se proširila po cijeloj Europi i ozbiljno ugrozila sastojine europskog pitomog kestena (*C. sativa* Mill.) (Heiniger i Rigling, 1994; Krstin i sur., 2008). U Hrvatskoj bolest je prvi put zabilježena 1955. godine odakle se proširila na sve kestenove sastojine (Novak-Agbaba, 2006).

Gljiva razvija nesavršeni (nespolni) stadij piknida, opisan kao *Endothiella parasitica*, i savršeni (spolni) stadij peritecija. U prirodi se češće razvija konidijski stadij, zato je taj

stadij značajniji za širenje bolesti od savršenog (Glavaš, 1999). *C. parasitica* je poput većine gljiva mješinarki haploidna (n) veći dio životnog ciklusa, dok do diploidizacije dolazi isključivo tijekom spolnog razmnožavanja. Spolno razmnožavanje može se odvijati samo među jedinkama različitog reproduktivnog tipa, iako je zabilježena i samooplodnja. Uspješnost procesa oplodnje kontrolirana je pomoću bialelnog reproduktivnog lokusa MAT koji sadrži različite MAT alele (MAT1-1 i MAT1-2) (Marra i Milgroom, 2001). Osim navedenog spolnog razmnožavanja, C. parasitica se može razmnožavati i nespolnim putem- fragmentacijom micelija ili nespolnim sporama (Rigling i Prospero, 2017).

Heiniger i Rigling (1994) navode kako se askospore i dijelovi micelija mogu prenositi vjetrom, pticama i kukcima. Također ljudi predstavljaju značajan vektor u prijenosu. Čovjek bolest prenosi alatom kojim je obrađivao zaražena stabla, zaraženim sadnicama, transportom zaraženog drveta i na druge načine. Čovjek je u širenju ove bolesti najviše pridonio (Glavaš, 1999).

Glavaš (1999) također navodi kako je *C. parasitica* parazit rana, što znači da joj je za zarazu potrebno ulazno otvoreno mjesto u kori. Najčešće su zaraze u rašljama grana i na mjestima gdje se grane dodiruju i međusobno taru. Zaraza se pojavljuje i na ranama koje nastaju prilikom mehaničkih oštećenja kore, prilikom izvoza drvnih sortimenata, zatim oštećenja od vjetra, ledene kiše, kukaca, ptica itd. *C. parasitica* patogen je kore koji inficira samo nadzemne dijelove biljke- stabljiku, grane i grančice (Rigling i Prospero, 2017).

Gljiva je vrlo agresivna i može zaraziti stabla bez obzira na njihovu vitalnost i dob (Novak-Agbaba i sur., 2000). Manifestacija simptoma koje inducira patogen na domaćinu varira ovisno o virulentnosti određenog soja *C. parasitica* i starosti zaraženog stabla (Rigling i Prospero, 2017). Najuočljivije su promjene na kori mladih stabala gdje nastaje plitko ulegnuće praćeno promjenom boje, od zagasite prema intenzivno crvenoj. Nadalje, javljaju se uzdužne raspukline, kora se odvaja te nastaju otvorene rak rane koje prati sušenje listova koje zimi ne otpada. U tkivu rakastih tvorevina vidljive su strome u vidu crvenih ispupčenja. Za vlažna vremena iz piknida u sluzi izbijaju konidije u obliku nepravilnih vitica koje se na kori vide u obliku narančastih roščića. Uz navedeno, siguran znak bolesti je i lepezasti micelij gljive koji se uočava ako se kora rascijepi u slojeve. Fitopatološke promjene kod starijih stabala se teže uočavaju zbog deblje i izbrazdane kore te činjenice kako kora ne mijenja svoju boju.

Međutim vidljive su suptilne promjene koje mogu ukazati na prisutnost gljive. Prvi znaci vidljivi su kada se kora izbrazda i na mjestima odvoji od debla. U većini slučajeva ne otpada nego se samo odigne. Da bi se bolest sa sigurnošću identificirala potrebno je koru odignuti u potrazi za lepezastim micelijem. Također se na površini kore, obično u pukotinama razvijaju crvenkaste strome i plodišta gljive, tj. piknide i periteciji. S vremenom unutar krošnje mogu se uočiti pojedine grane na kojima dolazi do lokalnog sušenja listova (Glavaš, 1999). Korijenov sustav jedini uspijeva preživjeti zarazu, pa izdanci mogu ponovno nicati (Heiniger i Rigling, 1994).

C. parasitica na mrtvim stablima prelazi na saprotrofni način života gdje može živjeti do desetak godina. Veliku opasnost predstavlja produkcija spora koja se i dalje odvija te čini nove izvore zaraze (Prospero i sur., 2006).

S obzirom na virulentnost gljive Halambek (1988.) razlikuje tri grupe simptoma: aktivan rak, površinska nekroza kore i kalusirajući rak. Uzročnik aktivnog raka je virulentan soj gljive kod kojeg micelij brzo napreduje do kambija, uzrokujući raspucavanje kore i otvoreni rak. Gljiva obilno fruktificira a ispod mjesta zaraze razvijaju se izbojci. Hipovirulentan soj gljive uzrokuje površinske nekroze kore gdje micelij sporo napreduje i ne prodire do kambija. Vidljiva je hipertrofija oboljelog mjesta a fruktifikacija je rijetka i nema pojave izbojaka ispod oboljelog mjesta. Kalusirajući rak formiran je prirodnim širenjem hipovirusa s površinskih nekroza na aktivni rak. Ta pojava predstavlja osnovu za biološku kontrolu bolesti i zaustavljanje zaraze zaraženih stabala (Novak – Agbaba i sur., 2011).

U visoko osjetljivih domaćina, *Castanea dentata* i *Castanea sativa*, simptomi *C. parasitica* uključuju pojavu rak rana (aktivan rak) i naposljetku smrt stabla. U tolerantnijim domaćinima (uglavnom *Quercus petraea*, a rjeđe *Quercus robur*, *Quercus ilex* i drugi hrastovi) *C. parasitica* se manifestira u obliku kalusiranih rakastih tvorevina (kalusirajući rak) ili površinske nekroze kore koje rijetko uzrokuju odumiranje grana, izbojaka ili cijeloga stabla (Mohammed i sur., 2011).

U istraživanjima provedenim u Slovačkoj (Adamčikova i sur., 2010), gljiva je utvrđena samo na hrastu kitnjaku i lužnjaku dok na *Quercus alba*, *Q. coccinea* i *Q. pubescens* nije zabilježena. Simptomi su bili teško prepoznatljivi zbog izrazito naborane i izbrazdane kore, te su za konačnu identifikaciju bolesti poslužili miceliji ispod kore. U navedenom istraživanju se pokazalo kako su rakaste tvorevine uglavnom povezane s

blagim odumiranjem grana. Također je potvrđeno kako se gljiva na hrastova stabla raširila sa zaraženih stabala kestena koja su se nalazila u blizini. Autori su na temelju značajno manje veličine i sporijeg rasta raka u usporedbi s pitomim kestenom utvrdili da gljiva pokazuje smanjenu virulenciju na hrastu.

1.3. Hipovirulentnost i biološka kontrola gljive *Cryphonectria parasitica*

U Sjevernoj Americi epidemija raka kestenove kore skoro je u potpunosti uništila sva američka stabla kestena (*Castanea dentata*), dok je u Europi zamijećen fenomen oporavka od bolesti kao rezultat prirodne pojave hipovirulentog izolata *C. parasitica* (Heiniger i Rigling, 1994). Hipovirulencija u *C. parasitica* je uzrokovana dvolančanim (ds) RNK virusom *Cryphonectria hypovirus* (CHV) iz porodice *Hypoviridae*, koji smanjuje virulentnost i sposobnost sporulacije zaraženih micelija gljive (Prospero i sur., 2006).

Kod gljive *C. parasitica* je hipovirulentnost dominantno svojstvo prenosivo na ostale sojeve gljive. Prenosi se anastomozom. Anastomoza je pojava kada se između dvije susjedne hife stvori zajednički most kroz koji je moguća izmjena jezgri i citoplazmi. Pri spajanju tih dvaju sojeva gljiva ta se dvolančana RNK prenosi u virulentni soj. Kada se iz stanice u koju je unesena RNK razvije nova gljiva, više neće biti agresivna kao virulentni roditelj, već će poprimiti u većoj ili manjoj mjeri odlike hipovirulentnog roditelja (Glavaš, 1999). Postojanost hifalne anastomoze ograničena je sustavom vegetativne inkompatibilnost (vik) gljive. To je sustav obrambenog mehanizma koji sprječava nastanak stabilne anastomoze zbog razmjene citoplazmički prenosivih bolesti. Vik sustav kontroliran je sa šest genskih lokusa, a na svakom lokusu su dva alela, što omogućuje 64 vik genotipa (Rigling i Prospero, 2017). Prema tome hipovirus se može prenijeti samo između vegetativno kompatibilnih tipova, odnosno između izolata koji dijele identične alele na svim lokusima vegetativne inkompatibilnosti (Krstin i sur., 2011).

Hipovirulencija se još prenosi nespolnim konidijama koje imaju važnu ulogu u širenju, dok spolne askospore nemaju sposobnost prenošenja. Slijedom toga, spolno razmnožavanje *C. parasitica* predstavlja glavnu prepreku u širenju virusa uzročnika

hipovirulencije budući da samo pridonosi širenju virulentnog oblika patogena. Štoviše, spolno razmnožavanje ima potencijal da zadrži ili poveća raznolikost vk tipova, rekombinacijom gena (Prospero i sur., 2006).

Iako je identificirano više od 70 tipova vk u cijeloj Europi (Robin i sur., 2009), raznolikost vk tipova na lokalnoj ili regionalnoj razini općenito je puno manja i lokalne populacije gljive se obično sastoje od jednog ili nekoliko dominantnih tipova vk (Robin i Heiniger, 2001).

Unutar porodice Hypoviridae pronađene su četiri različite vrste virusa. Taksonomski su povezani ali imaju različite genome u strukturi (Turina i Rostagno, 2007). Među njima (CHV-1, CHV-2, CHV-3 I CHV-4) najviše je pozornosti dano CHV-1 virusu (Hillman i Suzuki, 2004). *Cryphonectria hypovirus* 1 (CHV-1) je najznačajniji hipovirus i jedini do danas zabilježen na području Europe (Kristin i sur., 2011). Biološka kontrola CHV-1, bilo prirodno ili primijenjeno, vjerovatno je uspješnija u Europi zbog relativno male raznolikosti vk tipova u populacijama gljive, što je omogućilo prirodno širenje hipovirulencije (Heiniger i Rigling, 1994.; Robin i sur., 2000).

CHV-1 virus podjeljen je u pet podtipova koji čine: talijanski (CHV1-I), njemački (CHV1-D), španjolski (CHV1-E) i dva francuska (CHV1-F1 i CHV1-F2) (Montenegro i sur., 2008). Svi do sada dobiveni izolati hipovirusa iz Hrvatske svrstani su u talijanski podtip (CHV1 - I), koji je najrasprostranjeniji na području zapadne i zapadno-istočne Europe, uključujući i Hrvatsku (Allemann i sur., 1999; Kristin i sur., 2008).

Hipovirulenti sojevi gljive *C. parasitica* mogu se uz prirodno širenje prenositi i umjetnim putem - inokulacijom koja je pripomognuta antropogenim djelovanjem (Turchetti i Maresi, 1988). Umjetna inokulacija je u Hrvatskoj pokusno započeta 1983. godine (Kristin i sur., 2011). Biološka kontrola je općenito pogodna za upravljanje biljnim bolestima jer ima minimalan utjecaj na okoliš za razliku od drugih tipova mjera poput sanitarnih zahvata ili primjene fungicida koji su pretjerano skupi ili ekološki neprihvatljivi. Uspjeh općenito ovisi o poznavanju učestalosti hipovirusa (Milgroom i Cortesi, 2004). Kristin i sur.(2008) navode kako je za uspješnu biološku kontrolu bitno poznavati raširenost i raznolikost vk tipova radi odgovarajuće primjene hipovirulentnih izolata gljive. Pravilni odabir smanjuje potencijal patogene gljive i njezin učinak na zaraženim stablima.

1.4. Klonske sjemenske plantaže

U Hrvatskoj se započelo s osnivanjem klonskih sjemenskih plantaža već prije više desetljeća, i to ponajprije u znanstvene svrhe radi stjecanja iskustva (Vidaković, 1996).

Danas sjemenske plantaže čine najveću poveznicu između operativne šumarske prakse s jedne strane i oplemenjivanja i pratećih znanstvenih istraživanja s druge. Njihova je važnost višestruka: stvaranje izvora reprodukcijskog materijala prilagođenog promijenjenim klimatskim, stanišnim i gospodarskim uvjetima, koji će biti potreban budućim generacijama te služiti kao važan čimbenik u očuvanju genetske raznolikosti (Kajba i sur. 2009).

Sjemenske plantaže mogu biti generativne (sadržavaju potomstvo selekcioniranih superiornih stabala, bilo iz slobodnog ili iz kontroliranog oprašivanja) ili klonske (sadržavaju heterovegetativno selekcionirana superiorna stabla) (Kajba i sur. 2009).

Koncept klonskih sjemenskih plantaža zamišljen je tako da se fenotipski najbolja stabla, tzv. plus stabla, u plantaži međusobno oprašuju i oplođuju, ostvarujući na taj način genetsku dobit od 10 % i više (Vidaković, 1996).

Za većinu gospodarski važnih vrsta šumskoga drveća u Hrvatskoj, problemi prirodne obnove, kao i popunjavanje djelomično prirodno obnovljenih područja te pošumljavanje čistina, postoje već nekoliko desetljeća. Periodicitet plodonošenja u sastojinama nije pravilan, a vremenski se period do obilžnjeg ili punog uroda sjemena sve više produžuje (Kajba i sur., 2007). Orlić (2000) ističe kako prirodna obnova u našim hrasticima značajno izostaje iz godine u godinu te je nepotpuna, stoga je intervencija sjetvom sjemena ili sadnjom biljaka sve nužnija i učestalija.

Kao pripomoć prirodnoj obnovi šumskih sastojina, treba svake godine osigurati veće ili manje količine šumskog sjemena. Evidentna je potreba sjemena značajnijih listopadnih vrsta šumskog drveća krupnog sjemena (hrast lužnjak, hrast kitnjak , poljski jasen, obična bukva i dr.), kako zbog periodiciteta uroda dotičnih vrsta, tako i zbog nemogućnosti skladištenja njihova sjemena. Potrebe za sjemenom važnijih vrsta šumskog drveća pokazuju znatan godišnji manjak. Kako bi se ta negativna razlika umanjila ili pak anulirala te radi bolje organizacije proizvodnje genetski kvalitetnog sjemena, pristupilo se osnivanju klonskih sjemenskih plantaža (Kajba i sur., 2007).

Radi dobivanja kvalitetnog reproduktivnog materijala u RH osnovana je jedina klonska sjemenska plantaža hrasta kitnjaka (Slika 2), 2008. godine na području šumarije Požega (UŠP Požega) s 52 klona, o kojoj će u nastavku biti više riječi.



Slika 2. Klonska sjemenska plantaža Novoselci

2. CILJ RADA

U klonskoj sjemenskoj plantaži Novoselci (UŠP Požega) je tijekom 2018. godine uočena prisutnost patogene gljive *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M.E. Barr na kori hrasta kitnjaka (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.).

Cilj ovoga istraživanja bio je utvrditi brojnost i zaraženost klonskih sadnica hrasta kitnjaka u 2020. godini te izolacijom iz simptomatičnog tkiva kore na hranjivim podlogama dobiti čiste kulture gljive *Cryphonectria parasitica.* Na temelju morfoloških karakteristika dobivenih micelija gljive je izvršena karakterizacija na hipovirulentne, virulentne i prijelazne tipove.

Temeljem dobivenih rezultata broja i zdravstvenog stanja zaraženih klonova predložene su moguće mjere zaštite, kako bi se spriječila daljnja zaraza i u konačnici odumiranje stabala.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Područje istraživanja

Istraživanje je provedeno 18. lipnja 2020. godine na području klonske sjemenske plantaže Novoselci (Slika 3) na stablima hrasta kitnjaka koja su pokazivala znakove pojavnosti patogene gljive *Cryphonectria parasitica*.

Klonska sjemenska plantaža Novoselci osnovana je proljeće 2008. godine u blizini prometnice Požega - Slavonski Brod na površini 10,28 ha. Razlog osnivanja ovog sjemenskog objekta je kontrolirana proizvodnja sjemena (žira) hrasta kitnjaka s fenotipski kvalitetnih stabala lokalnog područja. Iz sastojina požeške i našičke podružnice Hrvatskih šuma, s područja sedam šumarija, odabrana su 52 plus stabla od kojih su cijepljenjem u plantažu Novoselci uvrštena 52 klona s razmakom sadnje 8 x 6 m. Ukupno je zasađeno 1245 klonova (rameta), jedinki dobivenih vegetativnim razmnožavanjem od orteta, izvornih (orginalnih) jedinki. U plantaži su klonske sadnice po uzgojnom obliku ovalnog vretena dok ukupna visina uzgojnog oblika iznosi do 7 m. Uz očuvanje genofonda, osnovana je i za potrebe šumsko - hortikulturnoga rasadnika Hajderovca (Šumarija Kutjevo) (Tomić, 2012).

Nalazi se u državnom vlasništvu Republike Hrvatske, a njome upravlja tvrtka Hrvatske šume d.o.o. Organizacijski pripada upravi šuma podružnici Požega (šumarija Požega, gospodarska jedinica Poljadijske šume; šumski predjel Novoselci; odjel/odsjek 43/e).

Plantaža se nalazi na 134,60 metara nadmorske visine na položajima 46°19´59˝ N, 17°46´ 59˝ E. Udaljenost plantaže od okolnih prirodnih sastojina kitnjaka iznosi otprilike 1,8 kilometara.



Slika 3. Položaj klonske sjemenske plantaže Novoselci

Prilikom dolaska u klonsku sjemensku plantažu provedena je kratka vizualna procjena klonskih sadnica. Plantaža je od osnutka bila dobrog zdravstvenog stanja, sve do pojave hrastove mrežaste stjenice te odumiranja grana i dijelova krošnje pojedinačnih stabala unazad par godina (prema usmenom priopćenju gospođe Ljiljane Fliszar, dipl. ing. šum.) Posjetom prof. dr. sc. Danka Diminića sa Šumarskog fakulteta u Zagrebu, 2018. godine uočena je prisutnost crvenonarančastih stroma i plodišta tj. piknida na kori osušenih grana, te utvrđena prisutnost patogene gljive *Cryphonectria parasitica*.

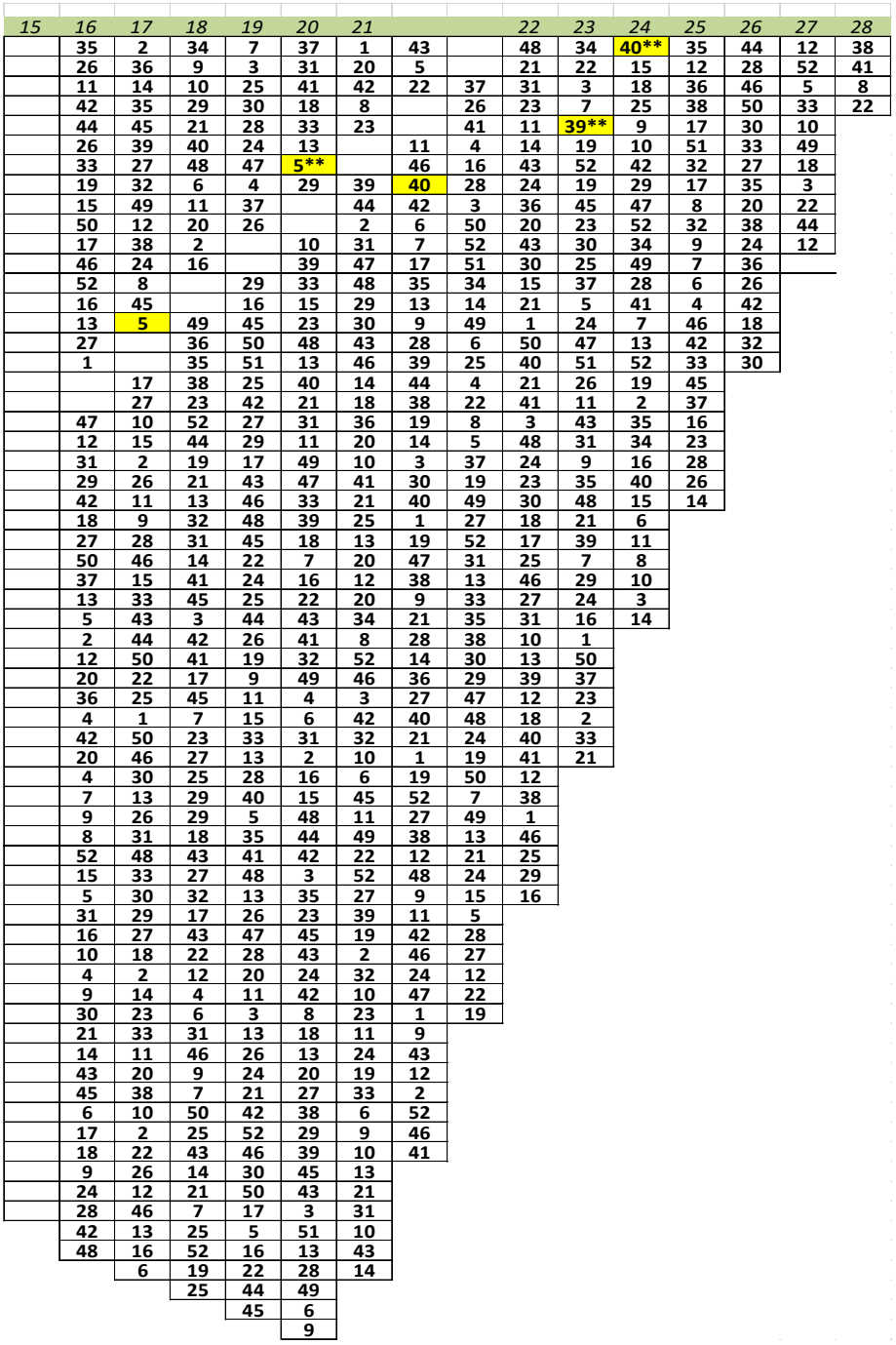
Potaknuti identifikacijom *Cryphonectria parasitica,* djelatnici šumarije su 15. lipnja 2020. godine prikupili podatke o stanju zaraženosti klonova. Od 52 klona, broj rameta jakog intenziteta iznosio je 67. Broj rameta srednjeg intenziteta 90 a broj rameta slabog intenziteta zaraze iznosio je 149.

3.2. Uzorkovanje na terenu

Prilikom ovog istraživanja uzorci su uzeti s jedanaest rameta koje pripadaju 52 klona (Slika 4 i 5). Uzorkovane ramete su pokazivale simptome zaraze, u vidu odumrlih grana ili dijelova krošnji te prisutnih stroma i plodišta gljive *Cryphonectria parasitica.* Na nekim je rametama uzeto više uzoraka, tj. više pojedinačnih grana ili dijelova kore. U nastavku se nalaze položaji rameta s kojih su uzeti uzorci u klonskoj sjemenskoj plantaži. Radi lakšeg prikaza plantaža je podijeljena na lijevu i desnu stranu.

1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*	*13*	*14*	
43	41	27	18	52	5	30	31	22	18	41	3	25	23	
29	39	35	17	4	38	3	12	28	12	30	16	15	39	
34	46	44	21	48	26	23	50	36	13	21	40	26	24	
24	33	52	13	2	45	9	1	37	34	6	44	20	46	
49	22	6	28	40	11	32	50	4	2	17	42	52	38	
15	9	42	14	10	47	19	35	5	43	11	8	43	47	
36	20	13	7	1	37	25	33	7	29	10	32	9	21	
31	10	37	16	19	12	44	40	22	32	49	11	34	10	
19	2	42	24	8	23	47	6	30	15	14	44	52	46	
45	46	35	43	14	18	39	18	4	9	50	7	42	19	
27	9	28	50	33	1	49	10	6	26	28	18	24	30	
14	31	13	29	5	17	21	34	25	21	20	17	29	42	
2	21	52	36	38	41	20	26	48	1	35	12	38	2	
25	27	45	25	15	4	3	7	43	33	27	39	23	31	
8	40	7	3	46	19	38	24	5	44	23	6	50	10	
32	13	28	50	36	11	6	42	15	33	5	52	17	46	
45	16	19	45	31	8	33	23	37	21	20	38	42	21	
36	3	41	49	32	18	17	46	47	30	49	27	12	34	
47	30	39	43	52	13	4	1	21	39	48	28	2	44	
37	29	51	46	22	25	10	20	14	40	19	22	36	15	
41	18	40	26	2	35	16	9	48	43	52	9	14	24	
29	9	51	50	18	3	40	10	37	15	42	51	46	1	
25	26	47	24	7	24	43	28	19	20	38	11	31		
13	45	4	52	49	22	8	42	46	43	17	4	30		
41	24	31	14	25	17	48	41	10	47	21	14		28	
18	11	23	21	6	35	26	16	34	27	48	7		18	
7	21	38	33	11	32	45	29	5	36	24			39	
22	3	39	2	13	9	12	44	4	1	15		36	2	
8	41	43	5	36	6	2	45	20	25	32		13	26	
9	35	16	17	13	46	11	42	14	43		23	12	47	
	27	33	48	24	18	41	52	11	9		39	44	10	
	2	50	1	44	50	22	38	35			12	29	6	
	26	9	23	12	34	26	18	39		20	42	4	47	
	25	3	47	30	3	33	27		7	19	5	25	30	
	10	29	21	28	31	8	29		40	9	38	46	17	
		16	43	30	12	46			3	32	52	42	27	
		1	24	5	2	7		10	9	27	10	8	45	
		37	17	24	32	35		21	40	23	19	42	11	
			39	50	13		45	33	25	18	40	33	41	
				8	42		22	28	42	47	50	26	11	
					25	5	44	52	15	21	23	14	7	
						48	11	26	9	4	10	21	35	
							20	30	10	3	42	16	22	
								31	29	27	24	31	30	
								41	19	38	43	10	2	
									18	42	25	21	27	
									36	9	5	24	9	
										11	39	1	47	
										32	21	44	46	
										12	19	14	52	
											17	38	2	
											6	20	7	
											33	16	18	
											25	9	23	
												48	28	
												31	30	
												4	11	
												41	27	
												2	33	
												29	24	

Slika 4. Raspored uzorkovanih klonova na lijevoj strani klonske sjemenske plantaže Novoselci



15	16	17	18	19	20	21			22	23	24	25	26	27	28
	35	2	34	7	37	1	43		48	34	40**	35	44	12	38
	26	36	9	3	31	20	5		21	22	15	12	28	52	41
	11	14	10	25	41	42	22	37	31	3	18	36	46	5	8
	42	35	29	30	18	8		26	23	7	25	38	50	33	22
	44	45	21	28	33	23		41	11	39**	9	17	30	10	
	26	39	40	24	13		11	4	14	19	10	51	33	49	
	33	27	48	47	5**		46	16	43	52	42	32	27	18	
	19	32	6	4	29	39	40	28	24	19	29	17	35	3	
	15	49	11	37		44	42	3	36	45	47	8	20	22	
	50	12	20	26		2	6	50	20	23	52	32	38	44	
	17	38	2		10	31	7	52	43	30	34	9	24	12	
	46	24	16		39	47	17	51	30	25	49	7	36		
	52	8		29	33	48	35	34	15	37	28	6	26		
	16	45		16	15	29	13	14	21	5	41	4	42		
	13	5	49	45	23	30	9	49	1	24	7	46	18		
	27		36	50	48	43	28	6	50	47	13	42	32		
	1		35	51	13	46	39	25	40	51	52	33	30		
		17	38	25	40	14	44	4	21	26	19	45			
		27	23	42	21	18	38	22	41	11	2	37			
	47	10	52	27	31	36	19	8	3	43	35	16			
	12	15	44	29	11	20	14	5	48	31	34	23			
	31	2	19	17	49	10	3	37	24	9	16	28			
	29	26	21	43	47	41	30	19	23	35	40	26			
	42	11	13	46	33	21	40	49	30	48	15	14			
	18	9	32	48	39	25	1	27	18	21	6				
	27	28	31	45	18	13	19	52	17	39	11				
	50	46	14	22	7	20	47	31	25	7	8				
	37	15	41	24	16	12	38	13	46	29	10				
	13	33	45	25	22	20	9	33	27	24	3				
	5	43	3	44	43	34	21	35	31	16	14				
	2	44	42	26	41	8	28	38	10	1					
	12	50	41	19	32	52	14	30	13	50					
	20	22	17	9	49	46	36	29	39	37					
	36	25	45	11	4	3	27	47	12	23					
	4	1	7	15	6	42	40	48	18	2					
	42	50	23	33	31	32	21	24	40	33					
	20	46	27	13	2	10	1	19	41	21					
	4	30	25	28	16	6	19	50	12						
	7	13	29	40	15	45	52	7	38						
	9	26	29	5	48	11	27	49	1						
	8	31	18	35	44	49	38	13	46						
	52	48	43	41	42	22	12	21	25						
	15	33	27	48	3	52	48	24	29						
	5	30	32	13	35	27	9	15	16						
	31	29	17	26	23	39	11	5							
	16	27	43	47	45	19	42	28							
	10	18	22	28	43	2	46	27							
	4	2	12	20	24	32	24	12							
	9	14	4	11	42	10	47	22							
	30	23	6	3	8	23	1	19							
	21	33	31	13	18	11	9								
	14	11	46	26	13	24	43								
	43	20	9	24	20	19	12								
	45	38	7	21	27	33	2								
	6	10	50	42	38	6	52								
	17	2	25	52	29	9	46								
	18	22	43	46	39	10	41								
	9	26	14	30	45	13									
	24	12	21	50	43	21									
	28	46	7	17	3	31									
	42	13	25	5	51	10									
	48	16	52	16	13	43									
		6	19	22	28	14									
			25	44	49										
				45	6										
					9										

Slika 5. Raspored uzorkovanih klonova na desnoj strani klonske sjemenske plantaže Novoselci

Uzorci su uzimani sjekirom, manjom ručnom pilom ili vrtnim škarama ovisno o veličini i položaju simptomatičnog tkiva. Uzimani su dijelovi kore (ako se radilo o deblu ili debljoj grani) ili segmenti grana (Slika 6) na kojima je bila prisutnost narančasto crvenih stroma sa plodištima, nepravilnih vitica konidija ili raspuklina na kori. Poslije svakog uzorkovanja alat je steriliziran 96 %-tnim etanolom kako bi se spriječilo eventualno kontaminiranje drugih klonova. Uzorci koje su činili segmenti grana su na poprečnim presjecima obilježeni brojem klona s kojeg su uzeti i stavljani su u plastičnu vreću. Uzorci s dijelovima kore stavljani su u papirnate vrećice koje su bile označene brojem klona s kojeg su uzete. Treba naglasiti kako su prilikom uzimanja uzoraka kore i njezinog odizanja uočeni lepezasti miceliji u stablu. Nakon prikupljanja, uzorci su istoga dana transportirani u Laboratorij za patologiju drveća Šumarskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi daljnje obrade, te su čuvani na sobnoj temperaturi.



Slika 6. Uzorak kore (lijevo) i uzorak segmenta grane (desno) s vidljivim stromama gljive *Cryphonectria parasitica*

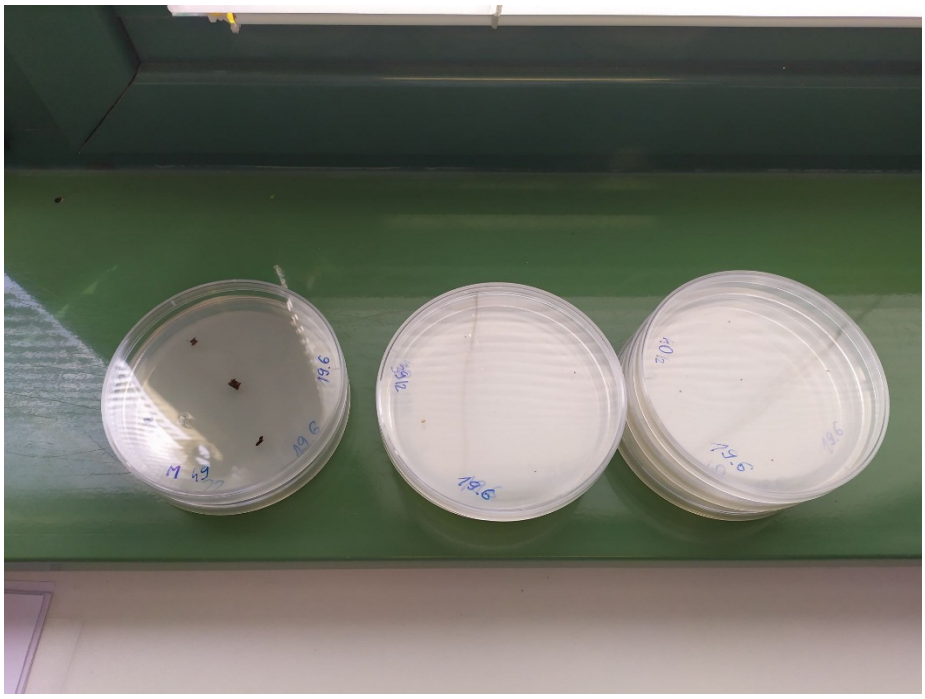
3.3. Izolacija micelija gljive

Uzorci su dan nakon prikupljanja na terenu obrađeni u Laboratoriju za patologiju drveća Zavoda za zaštitu šuma i lovno gospodarenje na Šumarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Izolacija gljive iz simptomatičnog tkiva obavljena je na radnoj površini stola koji je prethodno steriliziran 96%-tnim etanolom te prebrisan papirnatim ručnikom. Od pribora za izolaciju korišteni su skalpel, dvije igle, pinceta i plamenik. Uzorci s terena površinski su sterilizirani blagim tapkanjem pomoću papirnatog ručnika koji je prethodno natopljen 96 % etanolom. Sterilizirani su kako bi se uklonile eventualne nečistoće koje bi mogle kontaminirati uzorke koji će se koristi u daljnjoj laboratorijskoj analizi. Iz tako steriliziranih uzoraka pomoću sterilne igle ili skalpela zahvaćen je komadić narančasto crvene strome s plodištima gljive. Također su prikupljani dijelovi vitičastih konidija tzv. roščići (Slika 7) koji su također bili prisutni na uzorku te dijelovi kore koji su indicirali na moguću pojavnost patogene gljive. Uzorci su bili veličine jednog do dva milimetara.



Slika 7. Vitičasti nizovi konidija tzv. roščići koji izlaze iz piknida (nespolnih plodišta) gljive *Cryphonectria parasitica*

Sav korišteni pribor i alat je steriliziran u 96 % etanolu te kratko izložen plamenu. Sveukupno je po uzorku uzimano 5 segmenata biljnog ili gljivičnog tkiva koji su ravnomjerno raspoređeni po Petrijevoj zdjelici (promjera 9 cm), a hranjiva podloga na koju su stavljani uzorci bila je PDA (Potato Dextrose Agar) obogaćena antibiotikom (streptomicin sulfat, 0,2 g/L). Svaka Petrijeva zdjelica obilježena je datumom obrade te rednim brojem klona s kojeg je uzet uzorak (Slika 8).



Slika 8. Dijelovi biljnog i gljivičnog tkiva postavljeni na hranjivu podlogu

Nakon obavljene izolacije, Petrijeve zdjelice stavljene su u komoru rasta radi inkubacije u tami na temperaturi od 24°C na tjedan dana odnosno do trenutka pojave razvijenih micelija gljive.

Daljnji postupak analize odrađen je u laminarnom kabinetu za rad u atmosferi čistoga zraka. U tako kontroliranoj atmosferi analizirane su sve pripremljene Petrijeve zdjelice u potrazi za micelijima koje je stvorila *Cryphonectria parasitica.*

3.4. Presadnja i dobivanje čistih kultura

Miceliji s morfološkim karakteristikama gljive *C. parasitica* presađivani su u nove Petrijeve zdjelice (promjera 6 cm) na PDA hranjive podloge kako bi se dobile čiste kulture. Presadnja je izvedena pomoću sterilnog skalpela kojim je izrezan komadić micelija dimenzija 5 x 5 mm. Presađivani su rubni dijelovi micelija (Slika 9) u zoni najmlađih hifa kako bi se ubrzao rast iz tog dijela. Uzorci gljive stavljani su na sredinu Petrijeve zdjelice okrenuti naopako kako bi micelij bio u izravnom doticaju s hranjivom podlogom. Skalpel je steriliziran prilikom svake nove presadnje uranjanjem u 96 % etanol te kratkim izlaganjem plamenu. Ponovno je svaka Petrijeva zdjelica obilježena datumom presadnje te rednim brojem klona s kojeg je uzet uzorak. Nakon završene presadnje Petrijeve zdjelice s uzorcima stavljene su ponovno u komoru rasta na temperaturu od 24°C na tjedan dana odnosno do trenutka razvoja čistih kultura micelija.



Slika 9. Prikaz presađenog rubnog dijela micelija gljive *Cryphonectria parasitica*

3.5. Identifikacija čistih kultura i morfologija

Dobivene čiste kulture micelija promatrane su golim okom te na temelju morfoloških značajki, grupirane prema patogenosti odnosno agresivnosti gljive na virulentne, hipovirulentne i prijelazne tipove. Morfološke značajke odnosile su se prvenstveno na razliku u boji micelija gljive. Određivanje soja (patotipa) gljive provedeno je objektivno na temelju informacija prikupljenih iz literature u kojoj su opisani i prikazane karakteristike svakog micelija određenog tipa patogenosti. Glavaš (1999) navodi kako virulentni izolati gljive *C. parasitica* proizvode narančaste do žute micelije s mnogobrojnim brojem spora. Nasuprot njima, hipovirulentne izolate karakterizira bijeli micelij s manje spora. Prijelazne izolate, kao što i samo ime navodi, čini kombinacija virusnih i hipovirulentnih tipova, odnosno narančasto bijeli miceliji.

4. REZULTATI

U ovome poglavlju biti će prikazani rezultati dobiveni na temelju prethodno opisanih faza istraživanja.

Ukupno, istraživanje je obuhvatilo 11 rameta osam različitih klonova, s kojih je sveukupno prikupljeno 17 uzoraka. Na pojedinim rametama (5, 39, 40, 40/2) prikupljeno je više od jednog uzorka, odnosno više od jedne grane ili komada kore (Tablica 1). Također treba naglasiti kako su ramete istog klona, radi međusobnog razlikovanja obilježene oznakom /2.

Tablica 1. Broj ramete/klona i prikupljenih uzoraka biljnog tkiva

Klon/ rameta	**Broj uzoraka biljnog tkiva**
5	2
5/2	1
9	1
15	1
22	1
33	1
39	3
39/2	1
40	2
40/2	3
49	1
	∑=17

Od 17 prikupljenih uzoraka simptomatičnih grana i kore, na 13 su pronađene strome;na 2 su zabilježene piknide s masom konidija u obliku roščića, dok su preostala 2 bila bez vidljivih stroma i plodišta (Tablica 2).

Tablica 2. Uzorci sa stromama/piknidama

Simptomi na uzorku	Klonovi
Uzorci sa stromama	5
	5
	5/2
	15
	22
	33
	39
	40
	40
	40/2
	40/2
	40/2
	49
Uzorci s piknida s konidijama u obliku roščića	9
	39/2
Uzorci bez vidljivih stroma i piknida	39
	39

Iz 17 uzoraka simptomatičnog tkiva kore razvilo se 30 micelija *Cryphonectria parasitica* od kojih je presadnjom dobiveno 26 čistih kultura micelija. Na temelju morfoloških karakteristika (boje micelija), determinirano je 16 virulentnih, 8 prijelaznih i 2 hipovirulentna soja (Tablica 3).

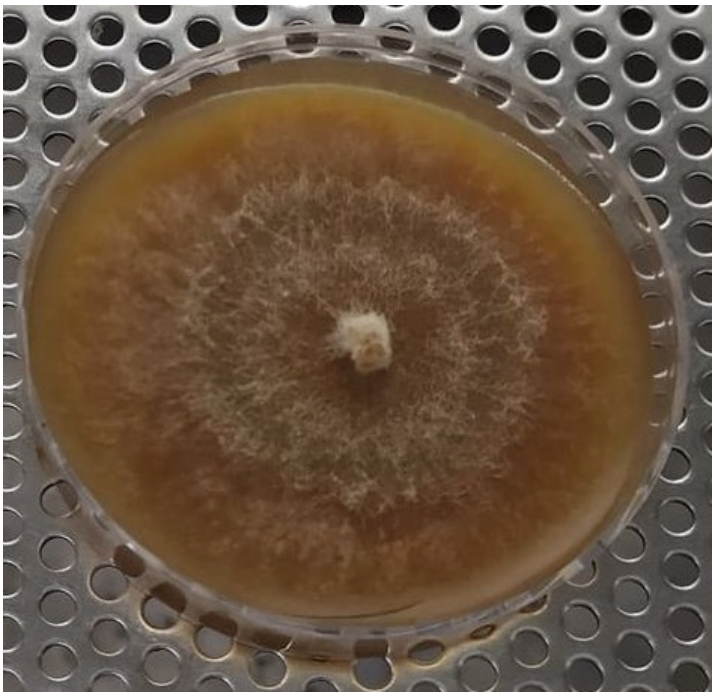
Tablica 3. Broj i pripadajući soj dobivenih kultura micelija po pojedinom uzorku

Oznaka uzorka	**Broj dobivenih čistih kultura micelija**	**Soj gljive**
5	2	virulentni
5	4	virulentni
5/2	3	2 virulentna 1 prijelazni
9	3	1 virulentni 2 hipovirulentna
15	5	4 virulentna 1 prijelazni
22	1	prijelazni
33	4	2 virulentna 2 prijelazna
40/2	4	1 virulentni 3 prijelazna



Slika 10. Udio pojedinog soja gljive *Cryphonectria parasitica* na uzorkovanim stablima hrasta kitnjaka

U nastavku se nalaze primjeri za virulentni (Slika 11), prijelazni (Slika 12) i hipovirulentni soj gljive (Slika 13) koji su dobiveni tijekom istraživanja.



Slika 11. Virulentni soj gljive *Cryphonectria parasitica*



Slika 12. Prijelazni soj gljive *Cryphonectria parasitica*



Slika 13. Hipovirulentni soj gljive *Cryphonectria parasitica*

5. RASPRAVA

Ovim istraživanjem otkriveno je više virulentnih sojeva gljive *Cryphonectria parasitica* u odnosu na hipovirulentne. To ukazuje da uzročnik hipovirulentnosti, dvolančana RNK molekula hipovirusa – *Cryphonectria hypovirus* (CHV) još nije toliko prisutna u populaciji gljive te prevladava agresivniji soj u klonskoj sjemenskoj plantaži.

U obzir također treba uzeti činjenicu kako je metodologija određivanja sojeva na temelju morfoloških karakteristika boje micelija manjkava. Iako je provedena objektivno na temelju informacija prikupljenih iz literature u kojoj su opisani i prikazane karakteristike svakog micelija određenog soja gljive, ne mora dati u potpunosti pouzdane rezultate. Za buduća istraživanja predlaže se najpouzdanija metoda- izolacija RNK iz dobivenih micelija te potvrda prisutnosti hipovirusa PCR amplifikacijom. U tom slučaju zanimljivo bi bilo usporediti podatke koji bi se dobili s ovim postojećima.

Također, treba uzeti u obzir kako je analizirano samo 8 od sveukupno 52 klona koliko je ih je prisutno u klonskoj sjemenskoj plantaži. Svi uzorkovani klonovi bili su generalno dobro razvijenog habitusa s gustom krošnjom, od kojih je na pojedinačnim klonovima uočeno sporadično sušenje dijelova grana bez većih estetskih promjena. Tek su detaljnijim pregledom uočene strome ili piknide s konidijama na kori grana ili debla te su prikupljani uzorci. Generalno, klonovi su odabrani na temelju vizualne procjene kojom je pregledan samo dio plantaže, zbog čega ostaje otvorena mogućnost da je gljiva prisutna i na većem broju klonova. U prilog tome idu i podaci o intenzitetu odumiranja krošnje (zaraze) koje su djelatnici šumarije prikupili 15. lipnja 2020. godine. Prema njihovoj evidenciji od ukupno 1244 rameta, na 67 njih je zabilježen jaki intenzitet zaraze, na 90 je prisutan srednji intenzitet zaraze dok je slabi intenzitet zaraze prisutan na 149 rameta. Iz ovih podataka može se zaključiti kako je *C. parasitica* umjereno prisutna unutar plantaže.

Tijekom uzorkovanja, uglavnom su uočene strome s peritecijima na uzorcima dok su piknide s konidijama zabilježene samo na dva uzorka. Sagledavajući biologiju *C. parasitica*, Glavaš (1999) navodi kako se u oboljeloj kori najprije razvijaju piknide koje nastaju u stromatskom tkivu i otvorima izbijaju na površinu kore. Razvoj piknida traje cijelu godinu. Kasno u jesen pojavljuju se periteciji, također u stromama. Uspoređujući

međusobno biologiju i prikupljene uzorke mogu se uočiti određene nepravilnosti. Piknide koje bi trebale biti najbrojnije i razvijati se tijekom cijele godine, najmanje su zabilježene na uzorcima. S druge strane, strome s peritecijima bile su najzastupljenije premda je uzorkovanje izvršeno početkom ljeta. Prisutnost većeg broja peritecija početkom ljeta ukazuje da su isti razvijeni otprije, odnosno barem od jeseni prethodne godine, što znači da je bolest na uzorkovanim stablima prisutna dulje, tj. da se ne radi o ovogodišnjim infekcijama. Manjak u brojnosti piknida je moguće posljedica sporijeg razvoja gljive *C. parasitica* na hrastovim klonskim sadnicama u odnosu na pitomi kesten, ili pak uzorkovanja tijekom sušnog razdoblja kada su u nedostatku vlage piknide manje uočljive i izražene jer izostaje karakteristično otpuštanje konidija u vitičastim žutim nizovima. Za sporiji razvoj gljive na hrastu je vjerojatno zaslužna i debljina kore. Poznato je kako bolest teče sporije na starijim stablima kestena za razliku od mlađih (Glavaš, 1999). Starija stabla kestena karakterizira deblja i izbrazdana kora baš kao što je to slučaj i kod hrasta kitnjaka. Stoga se slabije širene gljive može pripisati upravo debljini kore hrasta kitnjaka.

Uspoređujući simptome na klonskim sadnicama hrasta sa simptomima na kori starijih stabala pitomog kestena, opet se može povući paralela obzirom na debljinu kore. Debljina kore također ima značajnu ulogu u manifestaciji simptoma. Simptomi na zaraženim hrastovima bili su slični onima na kestenu ali manje primjetni. Teže su uočavane patološke promjene te nije bila prisutna promjena boje. Unatoč tome su zabilježene površinske nekroze kore, najviše zahvaljujući prisutnosti stroma i plodnih tijela gljive na površini te žuto-bijelog micelija ispod kore. Vezano uz nađene sojeve gljive, virulentni soj obično nakon nekog vremena uzrokuje rak rane odnosno aktivan rak, koji u ovom istraživanju nije uočen na uzorkovanim stablima. Pretpostavka je da je zaraza, iako s obzirom na prisutnost peritecija nije ovogodišnja, ipak još u početnoj fazi pa se još nisu razvili napredni simptomi, ili je debljina kore uzrokovala znatno sporiju progresiju simptoma.

Sličnost situacije na terenu može se povezati s istraživanjima na hrastu kitnjaku i hrastu lužnjaku provedenim u Slovačkoj (Adamčikova i sur., 2010). Uz simptome i općenitu sporiju progresiju bolesti, potvrđeno je kako se gljiva na hrastove proširila s obližnjih zaraženih stabala pitomog kestena u okolici. Stoga ne treba odbaciti mogući prijenos zaraze s pitomog kestena na hrasta kitnjak u klonskoj sjemenskoj plantaži

Novoselci, jer je ista relativno blizu kestenovim sastojinama (Ljiljana Fliszar, usmeno priopćenje).

Unatoč dominaciji virulentnih sojeva gljive treba obratiti pozornost da su pronađena dva potencijalna hipovirulentna izolata. Opet je naglasak na potencijalnim, s obzirom na metodologiju određivanja sojeva na temelju boje micelija koja je provedena vizualnom procjenom. Ipak može se pretpostaviti kako u klonskoj sjemenskoj plantaži najvjerojatnije postoji prirodno i lokalno prisutan virus hipovirulencije. Budući da su hipovirulentni izolati pronađeni samo na klonu broj 9, valjalo bi napraviti već spomenutu PCR analizu na plus stablu iz kojeg su cijepovi proizvedeni. Najviše cijepova (30) proizvedeno je od klona broj 9 iz GJ Južna Krndija čaglinska (odjel 21 a, Šumarija Čaglin) (Tomić, 2012). Dobiveni rezultati s plus stabla u spomenutoj šumariji zajedno s budućim rezultatima provedenim na plantaži zasigurno bi otvorila nova saznanja o biologiji i biološkom ciklusu *C. parasitica,* te pokazali pravu sliku stanja istraživanog područja.

Od četiri virusnih vrsta iz porodice *Hypoviridae*, *Cryphonectria hypovirus* – 1 (CHV-1) je najzastupljeniji u Europi te ga karakterizira velika raznolikost genotipova. CHV-1 virus podijeljen je u pet podtipova koji čine: talijanski (CHV1-I), njemački (CHV1-D), španjolski (CHV1-E) i dva francuska (CHV1-F1 i CHV1-F2) (Montenegro i sur., 2008). Talijanski je podtip (CHV1-I) najrasprostranjeniji i obično je povezan s velikom prirodnom prevalencijom hipovirulencije. Ova podvrsta je dominantna u Italiji, Švicarskoj, jugoistočnoj Francuskoj, Bosni i Hercegovini, Hrvatskoj, Sloveniji, Makedoniji, Grčkoj i Turskoj. Također su i svi do sada izolirani izolati hipovirusa iz Hrvatske svrstani u talijanski podtip (Allemann i sur., 1999., Krstin i sur., 2011). Premda nije napravljena identifikacija molekularnom analizom, pretpostavka je da pronađeni hipovirusi u klonskoj sjemenskoj plantaži Novoselci najvjerovatnije pripadaju talijanskom podtipu (CHV1-I). Hipovirulentnost čini osnovu za biološku kontrolu *C. parasitica* pri čemu je poželjnije koristiti lokalne izolate gljiva zaražene virusom radi očuvanja niske raznolikosti vk tipova.

Spomenuto je već kako su na uzorcima prevladavale strome s peritecijima za razliku od piknida s konidijama. To ukazuje na zastupljenost spolnog stadija gljive u klonskoj sjemenskoj plantaži kojom je prisutna izmjena gena između jedinki gljive a samim time i mogućnost stvaranja novih vk tipova. Spolno razmnožavanje *C. parasitica* predstavlja glavnu prepreku u širenju virusa uzročnika hipovirulencije budući da samo pridonosi

širenju virulentnog oblika patogena. Štoviše spolno razmnožavanje ima potencijal da zadrži ili poveća raznolikost vk tipova, rekombinacijom gena (Prospero i sur., 2006). Navedeno bi s vremenom moglo otežati primjenu biološke kontrole gljive u plantaži unošenjem hipovirulentnih sojeva, jer bi potencijalnim razvojem više vk tipova bila smanjena pojava anastomoze hifa i prijenosa virusa. Stoga je preporuka ovaj način zaštite provesti što prije moguće. Kristin i sur.(2008) navode kako je za uspješnu biološku kontrolu bitno poznavati raširenost i raznolikost vk tipova radi odgovarajuće primjene hipovirulentnih izolata gljive, stoga je preporuka provesti analizu postojećih vk tipova u KSP Novoselci.

Biološka kontrola je uspješnija u Europi upravo zbog relativno niske raznolikosti vegetativno kompatibilnih (vk) tipova što omogućuje prirodno širenje hipovirulencije za raziku od SAD gdje se visoka raznolikost vk tipova smatra glavnim razlogom neuspjeha provođenja biološke kontrole. Hipovirus se uspješno prenosi spajanjem hifa odnosno anastomozom između vegetativno kompatibilnih sojeva. Također se može prenositi i konidijama, dok askospore ne sudjeluju u širenju (Kristin i sur. 2011). Osim prirodnim načinom, širenje hipovirusa moguće je i ljudskom aktivnošću. Kako bi se povećala brojnost hipovirusa na području klonske sjemenske plantaže Novoselci, postoji potreba za umjetnim uvođenjem virusa inokulacijom zaraženih stabala hipovirulentnim sojem.

Terapijsko liječenje raka općenito se pokazalo uspješnije u klonskim plantažama gdje je uzgoj stabala kontroliran i gdje se primjenjuje odabrana mješavina hipovirulentnih sojeva jednako na sva stabla, za razliku od zapuštenih sastojina gdje nema kontrole ni upravljanja od strane čovjeka (Heiniger i Rigling, 1994; Milgroom i Cortesi, 2004). Također sastojine predstavljaju veliki problem prilikom provođenja biološke kontrole zbog velikih površina koje se trebaju tretirati, te dugog vremenskog perioda potrebnog za utvrđivanje širi li se hipovirus prirodno na populacijskoj razini (Milgroom i Cortesi, 2004; Robin i sur., 2010)

Upravo bi se inokulacija mogla predložiti za glavnu moguću mjeru zaštite od virulentnih tipova *C. parasitica* koji prevladavaju na području klonske sjemenske plantaže Novoselci. Biološka kontrola je općenito pogodna za upravljanje biljnim bolestima jer ima minimalan utjecaj na okoliš za razliku od drugih vrsta upravljanja poput sanitarnih zahvata ili primjene fungicida koji su pretjerano skupi ili ekološki neprihvatljivi. (Milgroom i Cortesi, 2004).

Značajnu ulogu za uspješnost biološke kontrole ima i regulacija fitosanitarnih zakona i mjera vezanih za transport biljnog materijala. U Republici Hrvatskoj nadzor nad provedbom propisa iz područja zaštite bilja provode granična i poljoprivredna inspekcija. Granična inspekcija zaštite bilja organizirana je kao poseban odjel unutar Ministarstva poljoprivrede i šumarstva, a njezine obveze proizlaze iz Međunarodne konvencije o zaštiti bilja (IUCN) odnosno Europske i Mediteranske organizacije zaštite bilja (EPPO) (Žabica, 1996).

Važnost temeljite regulacije proizlazi iz činjenice kako je *C. parasitica* izrazito agresivna gljiva što ide u prilog i činjenica da je u sklopu udruženja za svjetsku konzervaciju (IUCN) uvrštena u popis sto svjetski najgorih invazivnih vrsta organizama te predstavlja najveću prijetnju bioraznolikosti (Novak- Agbaba, 2006). Također je uvrštena na EPPO A2 listi karantenskih patogena (EPPO, 2005).

Montenegro i sur. (2008) navode kako je gljiva trenutno prisutna na područjima istočne i zapadne obale Sjeverne Amerike, Istočne Azije, središnje i južne Europe te u Africi na području Tunisa. U Europi bi širenje *C. parasitica* iz južnog dijela regije u sjevernija područja moglo prouzročiti znatne gubitke. Uvođenje novih sojeva moglo bi poremetiti europsku ravnotežu između postojećih virulentnih i hipovirulentnih sojeva što bi u konačnici moglo imati razarajući učinak na preostala područja u južnoj Europi (OEPP/EPPO, 1990). Važno je da mješavine hipovirulentnih sojeva budu lokani vk tipovi kako bi se spriječilo unošenje novih nepoznatih sojeva, jer bi oni mogli ometati prirodno širenje hipovirulentnosti (Robin i Heiniger, 2001).

Kako bi se spriječilo unošenje novih nepoznatih sojeva EPPO preporučuje da drvo vrsta *Castanea* ili *Quercus* iz zemalja u kojima se javlja *C. parasitica* treba oljuštiti, odnosno odvojiti koru od drveta. Razlog toga proizlazi iz činjenice kako se upravo u međunarodnoj trgovini gljiva može prenijeti na kori biljke domaćina. Također može se vršiti i dezinfekcija kore tako da se dezinficira u 5%-noj otopini 40%-tnog formaldehida i 5%-tnog natrijevog pentaklorfenolata tijekom pet minuta. Taj postupak trebao bi ubiti eventualnu prisutnost gljive na površini kore. Prilikom sadnje biljke trebaju dolaziti iz područja u kojima *C. parasitica* nije prisutna i gdje se bolest nije pojavila tijekom posljednje vegetacijske sezone (OEPP/EPPO, 1990).

Hipovirulencija se još uvijek smatra relativno novijom pojavom u biologiji *C.parasitica* i teško je predvidjeti evolucijsku dinamiku koja se ostvaruje u sustavu koji čine domaćin,

gljiva i hipovirus. Razvoj i integracija hipovirusa presudna je za održivost sustava biološke kontrole, koji je u Europi uglavnom prirodni fenomen. Ono što čini hipovirus CHV uspješan kao biološko sredstvo za kontrolu je upravo mogućnost njegova prenošenja na virulentne sojeve gljive i dominantnost u populaciji (Rigling i Prospero, 2017). Sojevi zaraženi CHV smanjuju patogeni učinak virulentnih sojeva, spolnu i nespolnu sporulaciju te produkciju pigmenta zbog čega je micelij hipovirulentnih sojeva bijele boje (Kazmierczak i sur. 1996).

U slučaju provođenja inokulacije u klonskoj sjemenskoj plantaži Novoselci, prikupljeni podaci o rasprostranjenosti i raznolikosti vk tipova su neprocjenjivo važni i čine osnovu za odabir odgovarajućih hipovirulentnih sojeva gljive. Potrebno je odabrati hipovirulentne sojeve gljive koji pokazuju najbolji učinak na smanjenje patogenosti gljive te s odabranom mješavinom sojeva gljive tretirati zaražena stabla (Krstin i sur., 2008; Sun i sur., 2009).

6. ZAKLJUČAK

U ovom diplomskom radu analizirano je zdravstveno stanje jedanaest stabala hrasta kitnjaka u klonskoj sjemenskoj plantaži Novoselci. Iz 17 uzoraka simptomatičnog tkiva kore razvilo se 30 micelija *Cryphonectria parasitica* od kojih je izolacijom dobiveno 26 čistih kultura micelija. Na temelju morfoloških karakteristika (boje micelija), determinirano je 16 virulentnih, 8 prijelaznih i 2 hipovirulentna soja. Ustanovljeno je više virulentnih sojeva gljive *Cryphonectria parasitica* u odnosu na hipovirulentne. To ukazuje da uzročnik hipovirulentnosti, dvolančana RNK molekula hipovirusa – *Cryphonectria hypovirus* (CHV) još nije toliko prisutna u populaciji gljive te prevladava agresivniji soj. Unatoč malom broju hipovirulentih sojeva dobro je što je otkrivena u populaciji te otvara mogućnost za nove spoznaje o biologiji i biološkom ciklusu *Cryphonectria parasitica* na promatranom području.

Kako bi se smanjio broj virulentnih sojeva, predlaže se antropogena metoda širenja hipovirulencije odnosno inokulacija. Inokulacija je biološka metoda kojom se gljiva unosi u živi organizam, odnosno u ovom slučaju stablo kitnjaka koje je zaraženo *C. parasitica*. Biološka kontrola je pogodna jer ima minimalan utjecaj na okoliš za razliku od sanitarnih zahvata ili primjene fungicida koji su u većini slučajeva ekološki neprihvatljivi.

Uz biološku metodu naglašava se važnost provedbe i regulacije fitosanitarnih zakona. Važno je da se koriste stabla koja dolaziti iz područja u kojima *C. parasitica* nije prisutna. Također je važno da se u klonskoj sjemenskoj plantaži prilikom korištenja potpornih kolaca kora sa debla oguli jer se gljiva može prenijeti putem kore.

U konačnici rješenje problematike klonskih sadnica hrasta kitnjaka glede zdravstvenog stanja, očuvanja biodiverziteta i dobivanja kvalitetnih sadnica nalazi se u interdisciplinarnom pristupu i sagledavanju problema. Bitno je sagledati širu sliku od samog zapažanja simptoma zato što su u većini slučajeva posljedice vezane poput karike lanca jedna na drugu i upravo zbog toga problem nikada nije sam već je ukomponiran u složeniji dinamički proces.

7. LITERATURA

Adamčikova, K., Kobza, M., Juhasova, G., 2010: Characteristics of the *Cryphonectria parasitica* isolated from Quercus in Slovakia. For. Path. 40, str. 443–449.

Allemann, C., Hoegger, P., Heiniger, U., Rigling, D., 1999: Genetic variation of *Cryphonectria hypoviruses* (CHV 1) in Europe assessed using restriction fragmant length polymorphism (RFLP) markers. Molecular Ecology 8, str. 843 – 854.

Anonymus, 2017: Šumskogospodarska osnova Šumskogospodarskog područja Republike Hrvatske za razdoblje od 2016. do 2025. Hrvatske šume, Zagreb, str. 672-677.

EPPO, 2005: Normes OEPP EPPO Standards. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 35, str. 271–273.

Franjević, M., Drvodelić, D., Kolar, A., Gradečki-Poštenjak, M., Hrašovec, B., 2018: Impact of oak lacebug *Corythucha arcuata* (Heteroptera: *Tingidae*) on pedunculate oak (*Quercus robur*) seed. Natural resorces, green technology and sustainable development, GREEN/3, str. 161- 165.

Franjić, J., Škvorc, Ž., 2017: Šumsko drveće i grmlje Hrvatske. Šumarski fakultet, Zagreb, str. 292.

Glavaš, M., 1999: Gljivične bolesti šumskoga drveća. Šumarski fakultet, Zagreb, str. 78-88.

Glavaš, M., 2011: Zaštita hrastovih sastojina od pepelnice (*Microsphaera alphitoides* Griff. et Maubl.). Croatian Journal of Forest Engineering 32, str. 205 – 210.

Halambek, M., 1988: Istraživanje virulentnosti gljive Endothia parasitica Murr./And. uzročnika raka kore pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.). Šumarski fakultet Zagreb, doktorska disertacija

Heiniger, U., Rigling D., 1994: Biological control of chestnut blight in Europe. Annual Review of Phytopathology 32, str. 581–599.

Hibbet, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., i sur., 2007: A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. Mycol Res 3, str. 509-547.

Hillman, B.I, Suzuki, N., 2004: Viruses of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. Adv Virus Res 63, str. 423-472.

Hrašovec, B., Posarić, D., Lukić, I., Pernek, M., 2013: Prvi nalaz hrastove mrežaste stjenice (*Corythucha arcuata*) u Hrvatskoj. Šumarski list br. (9-10), str. 499-503.

Kajba, D., Katičić I., Šumanovac, I., Žgela, M. 2009: Sjemenarstvo i očuvanje genofonda. Rad. Hrvat. Šumar. inst. 44 (1), str. 37–52.

Kajba, D., Pavičić, N., Bogdan, S., Katičić, I., 2007: Pomotehnički zahvati u klonskim sjemenskim plantažama listača. Šumarski list, br. 11-12, str. 523-528.

Kazmierczak, P., Pfeiffer, P., Zhang, L., Van Alfen, NK., 1996: Transcriptional Repression of Specific Host Genes by the Mycovirus *Cryohonectria Hypovirus* 1. Journal of Virology 2, str. 1137 – 1142.

Krstin, L., Novak-Agbaba, S., Rigling, D., Ćurković Perica, M., 2011: Diversity of vegetative compatibility types and mating types of *Cryphonectria parasitica* in Slovenia and occurrence of associated *Cryphonectria hypovirus 1*. Plant Pathology 60, str. 752 – 761.

Krstin, L., Novak-Agbaba, S., Rigling, D., Krajačić, M., Ćurković Perica, M., 2008: Chestnut blight fungus in Croatia: diversity of vegetative compatibility types, mating types and genetic variability of associated *Cryphonectria hypovirus* 1. Plant Pathology 57, str. 1086-1096.

Marra, RE., Milgroom, MG., 2001: The mating system of the fungus *Cryphonectria parasitica*: selfing and selfincompatibility. Heredity 86, str. 134 – 143.

Milgroom, M., Cortesi, P., 2004: Biological control of chestnut blight with hypovirulence: A critical analysis. Annu Rev Phytopathol 42, str. 311-338.

Mohammed, C., Cunnington, J., Robin, C., 2011: Chestnut blight caused by *Cryphonectria parasitica*. National diagnostic protocol, Vol. 11 V2, str. 4-8.

Montenegro, D., Aguin, O., Sainz, MJ., Hermida, M., Mansilla, JP., 2008: Diversity of vegetative compatibility types, distribution of mating types and occurrence of hypovirulence of *Cryphonectria parasitica* in chestnut stands in NW Spain. Forest Ecology and Management 256, str. 973-980.

Narodne novine, 2017: Naredba o poduzimanju mjera za sprječavanje širenja štetnog organizma *Corythuca arcuata* (Say, 1832) – hrastova mrežasta stjenica, NN 52/2017.

Novak – Agbaba, S., Ćelepirović, N., Ćurković Perica, M., 2011: Zaštita šuma pitomog kestena. Šumarski list , Posebni broj, str. 202 – 210.

Novak – Agbaba, S., Liović, B., Pernek, M., 2000: Prikaz sastojina pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.) u Hrvatskoj i zastupljenost hipovirulentnih sojeva gljive *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr. Radovi 35, str. 91-110.

Novak-Agbaba, S., 2006: Monitoring raka kore pitomog kestena na trajnim plohama. Radovi, Izvanredno izdanje, br. 9, str. 199 – 211.

OEPP/EPPO, 1990: Specific quarantine requirements. EPPO Technical Documents No. 1008. Russin, J.S.; Shain, L.; Nordin, G.L. (1984) Insects as carriers of virulent and cytoplasmatic hypovirulent isolates of the chestnut blight fungus. Journal of Economic Entomology 77, str. 838-846.

Orlić, S., 2000: Production of peduncled oak seedlings (*Quercus robur* L.) in Croatia from 1992 to 1998. Rad. Šumar. inst. 35 (1), str. 83–90.

Potočić, N., Seletković, I., Jakovljević, T., Indir, K., Medak, J., Ognjenović, M., Zorić, N., 2020: Oštećenost šumskih ekosustava Republike Hrvatske. Izvješće za 2019. godinu, Hrvatski šumarski institut, Jastrebarsko, str. 9-12.

Prospero, S., Conedera, M., Heiniger, U., Rigling, D., 2006: Saprophytic activity and sporulation of Cryphonectria parasitica on dead chestnut wood in forests with naturally established hypovirulence. Phytopathology 96, str. 1337-1344.

Rabitsch, W., 2008: Alien True Bugs of Europe (Insecta*: Hemiptera: Heteroptera*). Zootaxa, 1827, str. 1–44.

Rigling, D., Prospero, S., 2017: *Cryphonectria parasitica*, the causal agent of chestnut blight: invasion history, population biology and disease control. Molecular Plant Pathology, str 7-20.

Robin, C., Anziani, C., Cortesi, P., 2000: Relationship between biological control, incidence of hypovirulence, and diversity of vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* in France. Phytopathology 90 (7), str. 730–7

Robin C., Capdevielle, X., Martin, M., Traver, C., Colinas, C., 2009: *Cryphonectria parasitica* vegetative compatibility type analysis of populations in south – westwrn France and northern Spain. Plant Pathology 58, str. 527 – 535.

Robin, C., Heiniger, U., 2001: Chestnut blight in Europe: Diversity of *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence and biocontrol. Forest Snow and Landscape Research 3, str. 361-367.

Sun, Q., Choi, GH., Nuss, DL., 2009: Hypovirus-Responsive Transcription Factor Gene pro1 of the Chestnut Blight Fungus *Cryphonectria parasitica* Is Required for Female Fertility, Asexual Spore Development, and Stable Maintenance of Hypovirus Infection. Eukaryotic cell 3, str. 262 – 270.

Turchetti, T., Maresi, G., 1988: Mixed inoculum for the biological control of chestnut blight. Bulletin OEPP 18, str. 67 – 72.

Turina, M., Rostagno, L., 2007: Virus-induced hypovirulence in *Cryphonectria parasitica*: still an unresolved conundrum. Plant Pathology 89, str.165-178.

Tomić, I., 2012: Kontrolirana proizvodnja kitnjakovog žira za rasadnik Hajderovac. Hrvatske šume, br. 181/182, str. 4-7.

Vidaković, M. 1996: Podizanje klonske sjemenske plantaže hrasta lužnjaka. U: D. Klepac (ur.), Hrast lužnjak (*Quercus robur* L.) u Hrvatskoj. HAZU, Centar za znanstveni rad Vinkovci i Hrvatske šume d. o. o., Vinkovci – Zagreb, str. 127–138.

Žabica, Lj., 1996: Problematika inspekcijskog nadzora u području zaštite bilja. Sjemenarstvo, Zagreb, Vol. (13) No. 1-2, str. 125-132.