

Utjecaj gljive *Trichoderma tomentosum* Bissett na rast patogena *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M.E. Barr u dvojnim kulturama

Čaplinskij, Viktoria

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Forestry and Wood Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet šumarstva i drvne tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:108:776551>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-30**



Repository / Repozitorij:

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



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

VIKTORIA ČAPLINSKIJ

UTJECAJ GJLIVE *Trichoderma tomentosum* Bisset NA RAST
PATOGENA *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M.E. Barr U
DVOJNIM KULTURAMA

DIPLOMSKI RAD

ZAGREB, 2021.

**FAKULTET ŠUMARSTVA I DRVNE TEHNOLOGIJE
ŠUMARSKI ODSJEK**

**UTJECAJ GJLIVE *Trichoderma tomentosum* Bisset NA RAST
PATOGENA *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M.E. Barr U
DVOJNIM KULTURAMA**

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: Viktoria Čaplinskij

JMBAG: 0068225937

Broj indeksa: 1079/19

Datum odobrenja teme: 4.5.2021.

Datum predaje rada: 19.7.2021.

Datum obrane rada: 24.9.2021.

Zagreb, rujan 2021.

Dokumentacijska kartica

Naslov	Utjecaj gljive <i>Trichoderma tomentosum</i> Bisset na rast patogena <i>Cryphonectria parasitica</i> (Murrill) M.E. Barr u dvojnim kulturama
Title	Effect of <i>Trichoderma tomentosum</i> Bissett on growth of pathogenic fungus <i>Cryphonectria parasitica</i> (Murrill) M.E. Barr in dual cultures
Autor	Viktoria Čaplinskij
Adresa autora	Sovinjak 3, Buzet
Mjesto izrade	Sveučilište u Zagrebu, Fakultet šumarstva i drvne tehnologije
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	2021.
Obujam	38 stranica, 46 slika, 7 tablica, 42 navoda literature
Ključne riječi	hrast kitnjak, biološka kontrola, <i>Cryphonectria parasitica</i> , <i>Trichoderma tomentosum</i>
Key words	sessile oak, biological control, <i>Cryphonectria parasitica</i> , <i>Trichoderma tomentosum</i>
Sažetak	Gljive roda <i>Trichoderma</i> su poznate kao antagonisti patogenih gljiva te se često upotrebljavaju u biološkoj kontroli biljnih bolesti. U ovom će istraživanju biti ispitan antagonizam vrste <i>Trichoderma tomentosum</i> prema patogenoj gljivi <i>Cryphonectria parasitica</i> izoliranoj iz hrasta kitnjaka. Izolati gljiva će biti uzgajani u dvojnim kulturama na hranjivim podlogama u Petrijevim zdjelicama pri čemu će biti mjeren rast micelija.

	IZJAVA O IZVORNOSTI RADA	OB ŠFDT 09 03
		Revizija: 1
		Datum: 17.9.2021.

„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“.

Čaplinskij Viktoria

U Zagrebu, 24. rujna 2021.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.2 Hrast kitnjak (<i>Quercus petraea</i> (Matt.) Liebl.) i njegov značaj	1
1.3 <i>Cryphonectria parasitica</i> (Murrill) M.E. Barr i pojavnost na hrastovima (<i>Quercus</i> spp.)	5
1.4 Hipovirulentnost i biološka kontrola gljive <i>Cryphonectria parasitica</i>	7
1.5 Endofiti i njihova potencijalna uloga protiv patogenih gljiva	8
2. CILJ RADA	10
3. MATERIJALI I METODE	11
3.1 Priprema dvojnih kultura	13
4. REZULTATI	16
4.1 Varijabilnost u rastu korištenih izolata patogene i antagonističke gljive	17
4.2 Utjecaj antagonističke gljive na rast patogena <i>C. parasitica</i>	20
4.3 Utjecaj patogena <i>C. parasitica</i> na rast antagonističke gljive	21
5. RASPRAVA I ZAKLJUČAK	23
6. LITERATURA	26
7. PRILOZI	30
Prilog 1. Izgled micelija <i>Cryphonectria parasitica</i> i <i>Trichoderma tomentosum</i> u kontrolnim i dvojnim kulturama	30

Popis slika

Slika 1. Šuma hrasta kitnjaka i pitomog kestena (<i>Quercus-Castaneetum sativae</i>) (Vukelić, 2012).....	1
Slika 2. Areal hrasta kitnjaka (EUFORGEN, 2016)	2
Slika 3. Klonska sjemenska plantaža hrasta kitnjaka Novoselci.....	3
Slika 4. Položaj klonske sjemenske plantaže Novoselci.....	4
Slika 5. Uzorak grane zaražen gljivom <i>Cryphonectria parasitica</i>	12
Slika 6. Uzorci grana zaraženih gljivom <i>Cryphonectria parasitica</i>	12
Slika 7. Komadići strome gljive <i>Cryphonectria parasitica</i> pravilno raspoređeni u Petrijevoj zdjelici	12
Slika 8. Oznake na poledini Petrijevih zdjelica pripremljenih za mjerenje rasta micelija	14
Slika 9. Grafikon rasta tri izolata vrste <i>Cryphonectria parasitica</i> (CP1, CP2 i CP3) u dvojnim kulturama sa dva izolata vrste <i>Trichoderma tomentosum</i> (TT42 i TT43) i u kontrolnim kulturama	17
Slika 10. Međusobna usporedba rasta različitih izolata gljive <i>Cryphonectria parasitica</i>	18
Slika 11. Usporedba rasta različitih izolata gljive <i>Trichoderma tomentosum</i>	20
Slika 12. Utjecaj tipa kulture (dvojna kultura sa <i>Trichoderma tomentosum</i> , kontrola) na rast gljive <i>Cryphonectria parasitica</i>	21
Slika 13. Utjecaj tipa kulture (dvojne kulture sa tri izolata <i>C. parasitica</i> , kontrolne kulture) na rast gljive <i>Trichoderma tomentosum</i>	22
Slika 14. Izolat CP1 suprotstavljen izolatu TT42, prvo mjerenje, 25.1.2021. god.....	30
Slika 15. Izolat CP1 suprotstavljen izolatu TT43, prvo mjerenje, 25.1.2021. god.....	30
Slika 16. Kontrolna Petrijeva zdjelica sa izolatom CP1, prvo mjerenje, 25.1.2021. god.	30
Slika 17. Izolat CP1 suprotstavljen izolatu TT42, drugo mjerenje, 27.1.2021.g.....	30
Slika 18. Izolat CP1 suprotstavljen izolatu TT43, drugo mjerenje, 27.1.2021. god.....	31
Slika 19. Kontrolna Petrijeva zdjelica sa izolatom CP1, drugo mjerenje, 27.1.2021. god.	31
Slika 20. Izolat CP2 suprotstavljen izolatu TT43, prvo mjerenje, 25.1.2021. god.....	31
Slika 21. Izolat CP1 suprotstavljen izolatu TT42, prvo mjerenje, 25.1.2021. god.....	31
Slika 22. Kontrolna Petrijeva zdjelica sa izolatom CP2, prvo mjerenje, 25.1.2021. god.	32

Slika 23. Izolat CP2 suprotstavljen sa izolatom TT43, drugo mjerenje, 27.1.2021. god.	32
.....	32
Slika 24. Izolat CP2 suprotstavljen sa izolatom TT42, drugo mjerenje, 27.1.2021. god.	32
Slika 25. Kontrolna Petrijeva zdjelica sa izolatom CP2, mjerenje 27.1.2021. god.	32
Slika 26. Izolat CP3 suprotstavljen sa izolatom TT43, prvo mjerenje 25.1.2021. god.	33
Slika 27. Izolat CP3 suprotstavljen sa izolatom TT42, prvo mjerenje, 25.1.2021. god.	33
Slika 28. Kontrolna Petrijeva zdjelica sa izolatom CP3, prvo mjerenje, 25.1.2021. god.	33
.....	33
Slika 29. Izolat CP3 suprotstavljen sa izolatom TT42, drugo mjerenje, 27.1.2021. god.	33
Slika 30. Izolat CP3 suprotstavljen sa izolatom TT43, drugo mjerenje, 27.1.2021. god.	34
Slika 31. Kontrolna Petrijeva zdjelica sa izolatom CP3, drugo mjerenje, 27.1.2021. god.	34
.....	34
Slika 32. Izolat CP1 suprotstavljen sa izolatom TT42, drugo mjerenje, 27.1.2021.god.	34
Slika 33. Izolat CP2 suprotstavljen sa izolatom TT42, drugo mjerenje, 27.1.2021. god.	34
Slika 34. Izolat CP3 suprotstavljen sa izolatom TT42, drugo mjerenje, 27.1.2021. god.	35
Slika 35. Kontrolna Petrijeva zdjelica sa izolatom TT42, drugo mjerenje, 27.1.2021. god.	35
.....	35
Slika 36. Izolat TT43 suprotstavljen sa izolatom CP1, prvo mjerenje, 25.1.2021. god.	35
Slika 37. Izolat TT43 suprotstavljen sa izolatom CP2, prvo mjerenje, 25.1.2021. god.	35
Slika 38. Izolat TT43 suprotstavljen sa izolatom CP3, prvo mjerenje, 25.1.2021. god.	36
Slika 39. Kontrolna Petrijeva zdjelica sa izolatom TT43 prvo mjerenje, 25.1.2021. god.	36
.....	36
Slika 40. Izolat TT42 suprotstavljen sa izolatom CP3, drugo mjerenje, 27.1.2021.god.	36
Slika 41. Kontrolna Petrijeva zdjelica sa izolatom TT42, drugo mjerenje, 27.1.2021.god.	36
.....	36
Slika 42. Izolat TT42 suprotstavljen sa izolatom CP1, drugo mjerenje, 27.1.2021.god.	37
Slika 43. Izolat TT42 suprotstavljen sa izolatom CP2, drugo mjerenje, 27.1.2021. god.	37
Slika 44. Izolat TT43 suprotstavljen sa izolatom CP1 drugo mjerenje, 27.1.2021. god.	37
Slika 45. Izolat TT43 suprotstavljen sa izolatom CP3, drugo mjerenje 27.1.2021.god.	37
Slika 46. Kontrolna Petrijeva zdjelica sa izolatom TT43, drugo mjerenje, 27.1.2021. god.	38
.....	38

Popis tablica

Tablica 1. Broj Petrijevih zdjelica s dvojnim i kontrolnim kulturama i popis suprotstavljenih micelija	15
Tablica 2. Prikaz ukupnog prosječnog rasta izolata u dvojnim i kontrolnim kulturama ..	16
Tablica 3. Rezultati testa homogenosti varijanci za rast izolata <i>Cryphonectria parasitica</i> u različitim tipovima dvojnih kultura.....	18
Tablica 4. Rezultati Fischerovog LSD testa za rast izolata <i>Cryphonectria parasitica</i> u različitim tipovima dvojnih kultura.....	18
Tablica 5. Rezultati Mann-Whitney U testa za rast izolata <i>Trichoderma tomentosum</i> u različitim tipovima dvojnih kultura.....	19
Tablica 6. . Rezultati Fischerovog LSD testa za rast patogene gljive <i>Cryphonectria parasitica</i> u različitim tipovima dvojnih kultura.....	21
Tablica 7. . Rezultati Fischerovog LSD testa za rast izolata <i>Trichoderma tomentosum</i> u različitim tipovima dvojnih kultura.....	22

PREDGOVOR

Željela bih izraziti nekoliko riječi zahvale onim ljudima bez kojih sve ovo ne bi bilo moguće.

Želim se zahvaliti mentoru prof. dr. sc. Danku Diminiću na danim savjetima i smjernicama, ne samo prilikom izrade ovog diplomskog rada, već tokom cjelokupnog školovanja. Hvala Vam na prenesenom znanju koje ste sve ove godine nesebično dijelili sa nama studentima. Također, hvala Vam na svim životnim savjetima koje ste pružili nama studentima tijekom Vaših predavanja i njima ukazali na vrijenost života i naše struke.

Također, veliko hvala dragoj dr. sc. Jeleni Kranjec Orlović na uloženom trudu i vremenu te pomoći u svim aspektima ovog diplomskog rada. Hvala Vam što ste uvijek imali vremena i odgovore na sva moja pitanja. Hvala Vam na pozitivnom stavu i prenesenom znanju.

Hvala i dr. sc. Milivoju Franjeviću, prof. dr.sc. Borisu Hrašovcu koji su također sve ove godine nesebično dijelili svoje zanje sa nama studentima.

Također, veliko hvala svim ostalim profesorima koji su mi predavali.

Hvala svim mojim prijateljima i kolegama koji su ove studentske dane učinili puno ljepšim i vedrijim.

Najveću zahvalu želim iskazati svojim roditeljima i bratu Viktoru, na ljubavi i velikoj podršci tijekom svih dobrih, a i loših trenutaka tijekom studiranja. Hvala Vam za sve.

1. UVOD

1.2 Hrast kitnjak (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.) i njegov značaj

Hrast kitnjak listopadno je stablo iz porodice *Fagaceae*. Najčešće ga nalazimo u najrasprostranjenijem razredu šumske vegetacije u Europi, *Querco-Fagetea*. Razred *Querco-Fagetea* obuhvaća acidofilne do bazofilne, umjereno hladne do termofilne i vlažne do suhe listopadne šume nizinskih do predplaninskih pojasa. Glavne vrste u nižim dijelovima su poljski i gorski jasen, obični grab, hrast lužnjak i hrast kitnjak. Tom razredu pripada sveza *Querco-Castaneetum sativae*, šuma hrasta kitnjaka i pitomog kestena (Slika 1), koja je narasprostranjenija u sjeverozapadnoj Hrvatskoj i Banovini. Šuma hrasta kitnjaka i pitomog kestena raste na nadmorskim visinama od 250 do 600 metara, podjednako na svim ekspozicijama (Vukelić, 2012). Hrast kitnjak rasprostranjen je na području Europe, Kavkaza i Male Azije (Slika 2).



Slika 1. Šuma hrasta kitnjaka i pitomog kestena (*Querco-Castaneetum sativae*) (Vukelić, 2012)



Slika 2. Areal hrasta kitnjaka (EUFORGEN, 2016)

Hrast kitnjak raste kao stablo do 40 metara visine, tvoreći gustu i pravilnu razgranatu krošnju. Karakterizira ga korijenski sustav sa dobro razvijenom žilom srčanicom te plitko, uzdužno raspucana sivosmeđa kora. Raste u nizinskim, brežuljkastim i brdskim terenima. Najbolje uspijeva na svježim tlima. Budući da nema velike zahtjeve prema tlu u s obzirom na hranjivost, raste na kiselom, podzolastom i na slabo razvijenom skeletnom tlu (Franjić i Škvorc, 2010).

S obzirom da je hrast kitnjak gospodarski i ekološki važna vrsta drveća u hrvatskom šumarstvu, na području šumarije Požega (UŠP Požega) 2008. godine osnovana je prva i zasad jedina klonska sjemenska plantaža hrasta kitnjaka (Slika 3) u Republici Hrvatskoj koja sadrži 52 klona.



Slika 3. Klonska sjemenska plantaža hrasta kitnjaka Novoselci

Klonska sjemenska plantaža Novoselci osnovana je u blizini prometnice Požega – Slavonski Brod na površini od 10,28 ha zbog kontrolirane proizvodnje sjemena (žira) hrasta kitnjaka. 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 $46^{\circ}19'59''$ N, $17^{\circ}46'59''$ E. Udaljenost plantaže od okolnih prirodnih sastojina kitnjaka iznosi otprilike 1,8 kilometara (Slika 4). Stabla su dobivena cijepljenjem najkvalitetnijih stabala lokalnog područja, iz sastojina požeške i našičke podružnice Hrvatskih šuma, s područja sedam šumarija. Odabrana su 52 plus stabla iz kojih su postupkom cijepljenja proizvedeni klonovi kasnije posađeni u klonsku sjemensku plantažu Novoselci. Ukupno je zasađeno 1245 stabala (rameta) na razmaku od 8 x 6 m. Ukupna visina uzgojnog oblika iznosi 7 metara. Klonska sjemenska plantaža osnovana je za očuvanje genofonda ali i za potrebe šumsko-hortikulturnoga rasadnika Hajderovca (Šumarija Kutjevo) (Tomić, 2012).



Slika 4. Položaj klonske sjemenske plantaže Novoselci

Prije nekoliko godina u plantaži se pojavila hrastova mrežasta stjenica te je primijećeno odumiranje grana i dijelova krošnje pojedinačnih stabala (prema usmenom priopćenju gospođe Ljiljane Fliszar, dipl. ing. šum.). Prof. dr. sc. Danko Diminić sa Fakulteta šumarstva i drvne tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, 2018. godine uočio je prisutnost crvenonarančastih stroma i plodišta tj. piknida na kori osušenih grana, te je utvrdio prisutnost patogene gljive *Cryphonectria parasitica*.

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

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

Cryphonectria parasitica je prvenstveno patogen kestena (*Castanea* spp.), a po taksonomiji spada u gljive mješinarke, razred *Sordariomycetes* te red *Diaporthales* (Hibbet i sur., 2007). Patogen je podrijetlom iz Istočne Azije, a proširio se i na druge kontinente (Glavaš, 1999). Uzrokuje površinske nekroze kore te rak-rane i kalusirajuće rakaste tvorevine na stablima, onemogućujući normalno kolanje sokova što naposljetku može dovesti do smanjenja prirasta, pada vitaliteta stabala i venuća dijelova ili čitave krošnje.

U Europi se bolest proširila iz Italije gdje je prvi puta pronađena 1938. godine te je ugrozila sastojine europskog pitomog kestena (*C. sativa* Mill.) (Heiniger i Rigling, 1994; Krstin i sur., 2008). *Cryphonectria parasitica* danas je prisutna na svim šumskim površinama na kojima je zastupljen pitomi kesten. U Republici Hrvatskoj kao karantenska bolest prvi je puta zabilježena na području Opatije 1995. godine (Glavaš, 1999).

Na hrastu kitnjaku bolest je zabilježena u Mađarskoj 2009. godine (Ilona i sur., 2009). U razdoblju između 2003. i 2009. godine provedeno je istraživanje u Slovačkoj na sedam lokaliteta sastojina pitomog kestena i hrasta kitnjaka te je uočena zaraza od 15,8 % hrasta kitnjaka vrstom *Cryphonectria parasitica* (Adamcikova i sur., 2010). *Cryphonectria parasitica* zabilježena je na hrastu kitnjaku i u Švicarskoj (Bissegger i Heiniger, 1991).

Godine 2011. istraživanje provedeno u Mađarskoj, na tri različita lokaliteta, u kestenovo-hrastovim sastojinama pokazalo je da su simptomi zaraze vrstom *Cryphonectria parasitica* na hrastovima bili slični onima na kestenu ali manjeg intenziteta. Na hrastovima uočeni su kalusirajući rakovi i površinske nekroze kore, ali simptomi nisu uključivali venuće i odumiranje stabala (Perlerou i Diamandis, 2006).

Gljiva razvija dva stadija, nesavršeni (anamorfni) stadij piknida, *Endothiella parasitica*, koji se u prirodi češće javlja pa je time značajniji za širenje bolesti te savršeni (telemorfni) stadij peritecija (Glavaš, 1999). U zaraženoj kori prvo se razvijaju piknide koje nastaju u stromatskom tkivu i kroz otvore izbijaju na površinu kore. Piknide se razvijaju cijelu godinu osim za vrijeme izuzetno hladnih dana. U piknidama se nalaze sitne konidije te jedna

piknida može sadržavati čak 115 milijuna konidija. Na kraju jeseni se javljaju periteciji koji se mogu razviti u stromi u kojoj su se razvile i piknide. Iz tkiva kore i strome izlaze vratovi peritecija na površinu. Jedna stroma sadrži više peritecija u kojima se razvijaju askusi sa askosporama. Za vrijeme visoke zračne vlage dolazi do bubrenja piknida i peritecija te iz njih, na površinu kore, u obliku nepavilnih niti, izlaze konidije, odnosno askospore. Obje vrste spora se mogu prenositi vjetrom, kišom, kukcima, pticama, a može ih prenositi i čovjek te on ima odlučujuću ulogu u širenju bolesti na veće udaljenosti (alatom, zaraženim sadnicama te transportom zaraženog drveća). *Cryphonectria parasitica* je parazit rana, a to znači da je za zarazu potrebno oštećenje na kori, odnosno otvoreno mjesto na kori što je najčešće na rašljama grana i na mjestima gdje se rane dodiruju i zbog izazvanog trenja na tim mjestima ima najviše pukotina. Rane na stablima mogu biti izazvane mehaničkim oštećenjima izazvanim vjetrom, ledom, snijegom i ostalim ekstremnim klimatskim čimbenicima (Glavaš, 1999). Kada zarazi stablo gljiva u tkivo kore ispušta toksine kojima ubija susjedne stanice u koje se dalje širi micelij. Klijanje spora i rast micelija mogući su na temperaturama od 7 °C do 35 °C no s obzirom na sporiji tijek bolesti u jesen nego u proljeće ipak patogenu odgovaraju nešto više temperature. Stara stabla imaju deblju koru te patogen teže prodire u koru te su zbog toga ugroženija mlada stabla. Na odumrlim dijelovima kore stvaraju se piknide i periteciji pa se stabla nanovo budu inficirana (Glavaš, 1999).

Utvrđeno je da se *Cryphonectria parasitica* raščlanjuje na niz patotipova različite virulentnosti. Manifestacija simptoma koje inducira patogen varira ovisno o virulenciji određenog soja *Cryphonectria parasitica* i starosti stabla (Heiniger i Rigling, 1994; Prospero i Rigling, 2013). Prvi simptomi na zaraženim stablima mogu se uočiti mjesec dana nakon zaraze. Prvi simptomi su promjene kore na mjestu zaraze. Na mlađim stablima kora mijenja boju u crvenosmeđu, a na starijim stablima prvi simptom vidi se kao uzdužno pucanje kore zbog čega je teško prepoznati napad patogena na samom početku. Višegodišnji rakovi stvaraju se na debljim granama ili stabljikama, koji se mogu javiti godinama prije nego što izazovu odumiranje staba. *Cryphonectria parasitica* u kambiju razvija žuti micelij te ako razori kambij dolazi do pojave nekrotičnih lezija. Listovi venu, postaju žuti ili smeđi i obično ostaju visjeti na zaraženim mrtvim granama (Diller, 1965).

1.4 Hipovirulentnost i biološka kontrola gljive *Cryphonectria parasitica*

Biološka kontrola uključuje korištenje mikroorganizama koji svojim djelovanjem smanjuju populaciju štetnika i štetno djelovanje patogena te tako štite biljku od mogućih negativnih posljedica (Sharma, 2014). Biološka kontrola gljive *C. parasitica* je moguća pomoću virusa koji smanjuje njenu agresivnost.

Cryphonectria parasitica raščlanjuje se na niz patotipova različite virulentnosti te uzrokuje simptome čija pojavnost ovisi o virulenciji određenog soja i starosti stabla (Prospero i Rigling, 2013). Generalno se razlikuju virulentni i hipovirulentni patotip gljive. Hipovirulentni soj je manje agresivan za domaćine, jer sadrži dvostruku RNK, odnosno virus. Dvolančani RNA virus *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV-1) smanjuje virulentnost i sposobnost sporulacije zaraženih sojeva gljive *Cryphonectria parasitica* te smanjuje mogućnost spolnog razmnožavanja gljive (Prospero i sur., 2006).

Poznata su 4 virusa iz porodice *Hypoviridiae*, a to su CHV 1, CHV 2, CHV 3 i CHV 4. Navedeni virusi genetički su vrlo različiti ali su taksonomski povezani. Najbolje opisan i najzastupljeniji virus u Europi je *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV 1). Pretpostavlja se da je virus unesen u Europu zajedno sa patogenom *Cryphonectria parasitica* iz Azije početkom 19. stoljeća. Virus se nalazi u citoplazmi gljive, unutar membranskih vezikula, a promjera je 50-80 nm (Gobbin i sur., 2003). Virus ne sadrži proteinski omotač i strukturne proteine te ne stvara zrele infektivne virusne čestice. *Cryphonectria hypovirus 1* smanjuje pigmentaciju gljive, pa je izolat bijele ili bijelo-žute boje. Prvi kalusirajući rakovi kore i hipovirulentni uzorci gljive *Cryphonectria parasitica* bijele boje zabilježeni su početkom 80-ih godina u Hrvatskoj i Sloveniji (Halambek, 1986; Robin i Heninger, 2001), a početkom 60-ih godina zabilježeni su u Italiji i Francuskoj (Robin i Heninger, 2001).

Virusi iz hipovirulentnih sojeva gljive *Cryphonectria parasitica* mogu se prenositi na virulentne sojeve unutarstaničnim putem koji može uključivati prijenos putem spora ili prijenos putem anastomoze i heterokarionskih događaja. Virulentni soj gljive prodire do kambija, ali zaraza tog soja hipovirusom iz hipovirulentnog soja gljive uzrokuje nastanak kalusa (Krstin, 2009). U Europi zamijećen je fenomen oporavka od bolesti kao rezultat prirodne pojave hipovirulentnog izolata *Cryphonectria parasitica* (Heiniger i Rigling, 1994).

U svim istraživanim populacijama gljive *Cryphonectria parasitica* u Hrvatskoj utvrđen je i virus CHV 1 što omogućuje prirodnu biološku kontrolu patogena (Krstin i sur., 2008). Osim ovog načina biološke kontrole bolesti, potencijal leži i u uporabi endofita sa antagonističkim djelovanjem prema ovome patogenu.

1.5 Endofiti i njihova potencijalna uloga protiv patogenih gljiva

Antagonističke gljive izravno ili produktima svojeg metabolizma mogu utjecati na smanjenje populacije biljnih štetnika i patogena. Čak 90 % antagonističkih gljiva koje se upotrebljavaju u biološkoj kontroli pripadaju rodu *Trichoderma* (Benitez i sur., 2004). Najčešće vrste iz roda *Trichoderma* koje se koriste u biološkoj kontroli su *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* i *Trichoderma koningii* (Sharma, 2014). Mehanizmi djelovanja vrste *Trichoderma* obuhvaćaju interakcije hiperparazitizma, antibioze i kompeticije za hranjive tvari i prostor. Različite vrste roda *Trichoderma* proizvode litičke enzime (hitinaze, celulaze, pektinaze i proteaze) koji razgrađuju dijelove stanične stijenke patogenih gljiva te na taj način djeluju na njihovo suzbijanje. Djelovanjem litičkih enzima omogućen je jednostavniji prodor sekundarnih metabolita čije je djelovanje antifugalno. Vrste roda *Trichoderma* u rizosferu izlučuju male peptide, auksine, hlapljive spojeve i ostale aktivne metabolite koji utječu pozitivno na grananje korijena i time je veći unos hranjivih tvari što pozitivno utječe na rast stabala (Lopez i sur., 2015).

Rod *Trichoderma* obuhvaća nekoliko vrsta čije djelovanje pokazuje potencijal u borbi protiv patogena biljaka i drveća (Harman i sur., 2004). Nekoliko sojeva vrste *Trichoderma*, poput *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum* i *Trichoderma polysporum*, uspješno se primjenjuju za suzbijanje patogena *Fusarium circinatum* u čileanskim i novozelandskim šumskim rasadnicima. Za ovu svrhu *Trichoderma* se proizvodi fermentacijom u čvrstom stanju i inokulira u rastuće podloge i korijenje vrste *Pinus radiata* tijekom uzgojnog procesa stabla (Reglinski i Dick, 2005., Moraga i sur., 2011). Inokulacija sadnica vrste *Pinus radiata* bio-inokulatom vrste *Trichoderma* pozitivno je utjecao na trulež korijena uzrokovano patogenom vrstom iz roda *Armillaria* na na boru. Istraživanje provedeno u Mađarskoj pokazalo je da sadnice hrasta zaražene patogenom vrstom iz roda *Armillaria* tretirane sa vrstama *Trichoderma virens* i *Trichoderma atrobrunneum* pokazuju bolje

preživljavanje u lošim uvjetima tla od onih koji nisu raste u uvjetima tla koji nisu tretirani (Chen i sur., 2019).

Osim gljiva iz roda *Trichoderma* u biološkoj kontroli mogu sudjelovati i drugi endofiti (Fravel i sur., 2003).

Prvi biofungicid na bazi antagonističke gljive *Trichoderma harzianum* koji je bio prisutan na hrvatskom tržištu bio je Trichodex. Bio je na bazi izolata T39 čija aktivnost je bila enzimatska, a koristio se za suzbijanje sive plijesni vinove loze i jagoda. Ovisno o vremenskim uvjetima djelotvornost pripravka Trichodex iznosila je od 13 do 55 %. Ovo sredstvo danas više nije registrirano za uporabu na tržištu Hrvatske (Topolovec-Pintarić, 2019).

Zbog jednostavne registracije pripravaka na bazi vrsta iz roda *Trichoderma* spp. njihova raširenost je velika te postoji niz dopuštenih pripravaka u ekološkom uzgoju u Europi kao što su: RootShield (sjeverna Europa), Plant Box (sjeverna Europa), Bio Trek (sjeverna Europa), Binap (Švicarska, Švedska, Velika Britanija), Supersivit (Češka), Trichodex (Italija), Trifender (Mađarska) i Trianum (Španjolska). Pripravci na bazi vrsta *Trichoderma* spp. ne temelje se na samo jednoj vrsti nego su najčešće kombinacija dvije ili tri vrste iz roda *Trichoderma* spp. (Topolovec-Pintarić, 2019).

Trenutno je u Hrvatskoj prisutan samo jedan biofungicid (Proradix), na bazi bakterije *Pseudomonas*, a koristi se za suzbijanje uzročnika bolesti bijele noge (*Rhizoctonia solani*) na krumpiru, batatu, čičoki i kineskom jamu te za suzbijanje uzročnika srebrolivosti gomolja (*Helminthosporium solani*) na krumpiru. Osim bakterije iz roda *Pseudomonas* u biološkoj kontroli mogu sudjelovati i bakterije iz rodova *Bacillus* i *Streptomyces*. Mehanizam djelovanja antagonističkih bakterija temelji se na interakcijama antibioze, kompeticije, parazitizma i inducirane rezistentnosti (Pal i Gardener, 2006).

Istraživanje provedeno u Massachusettsu u kojem je cilj bio utvrditi je li vrsta *Trichoderma autoviride* učinkovita u biološkoj kontroli protiv patogene vrste *Cryphonectria parasitica*, pomoću postavljanja dvojnih kultura na hranjive podloge te pokusa u plantažama američkog kestena, pokazalo je da vrsta *Trichoderma autoviride* ima potencijal u biološkoj kontroli pri suzbijanju patogene vrste *Cryphonectria parasitica* na kestenu (Gonzales i Ferguson, 1998).

2. CILJ RADA

Zbog svjesnosti o prekomjernom korištenju kemijskih sredstava te njihovog negativnog utjecaja na stabla, a i čitav ekosustav te ljudsko zdravlje, sve je veći interes za metode biološke kontrole uzročnika biljnih bolesti. Jedna od potencijalnih metoda je korištenje endofitskih antagonističkih gljiva koje su i prirodno prisutne u ekosustavu. U ispitivanjima učinkovitosti takvih gljiva, početni korak je najčešće promatranje rasta i međusobnog utjecaja antagonističke i patogene gljive u dvojnim kulturama. Na taj se način dobivaju preliminarni podaci o potencijalu istraživanog endofita da inhibira rast patogena.

Radi očuvanja klonskih sjemenskih plantaža hrasta kitnjaka zaraženih patogenom gljivom *Cryphonectria parasitica*, cilj ovog diplomskog rada je bio ispitati učinkovitost jedne od metoda biološke zaštite. Cilj je bio utvrditi djelovanje vrste *Trichoderma tomentosum* na rast patogene gljive *Cryphonectria parasitica* u dvojnim kulturama. Utvrđivan je međusobni utjecaj između tri izolata gljive *Cryphonectria parasitica* i dva izolata gljive *Trichoderma tomentosum*.

3. MATERIJALI I METODE

U istraživanju su korištena dva različita izolata vrste *Trichoderma tomentosum* te tri različita izolata patogene gljive *Cryphonectria parasitica*.

Izolati gljive *Trichoderma tomentosum* su preuzeti iz baze micelija koji se nalaze na dugoročnoj pohrani u Laboratoriju za patologiju drveća Zavoda za zaštitu šuma i lovno gospodarstvo na Fakultetu šumarstva i drvne tehnologije (Sveučilište u Zagrebu). U istraživanju su korišteni izolati FALO42 i FALO43 koji se, radi lakšeg praćenja, u daljnjem tekstu navode kao TT42 i TT43. Navedeni su dobiveni iz drvnih stanica poljskoga jasena (*Fraxinus angustifolia* Vahl) sa područja Lonjskoga polja tijekom 2017. g.

Korišteni izolati gljive *Cryphonectria parasitica* su dobiveni iz uzoraka zaraženih grana hrasta kitnjaka (Slika 5 i 6), postupkom izolacije na hranjive podloge 26.11.2020. godine. Izolacija je izvršena na radnoj površini prethodno dezinficiranoj 96%-tnim etanolom. Uzorci s terena površinski su sterilizirani na način da su lagano prebrisani papirnatim ručnikom natopljenim 96%-tnim etanolom. Stroma gljive vidljiva na površini zaražene kore uzimana je pomoću laboratorijskog skalpela i laboratorijske pincete, prethodno steriliziranih u 96%-tnom etanolu i kratko izloženih plamenu. Uzorci su uzimani na način da se pomoću skalpela lagano zarezalo na granu na mjestu gdje se nalazio micelij gljive te je komadić micelija stavljen u Petrijevu zdjelicu u kojoj je prethodno bila pripremljena hranjiva podloga PDA (Potato Dextrose Agar, ThermoFisher Scientific, SAD) te je dodan antibiotik (streptomycin sulfat, 0,2 g/1 L, Sigma-Aldrich, SAD).

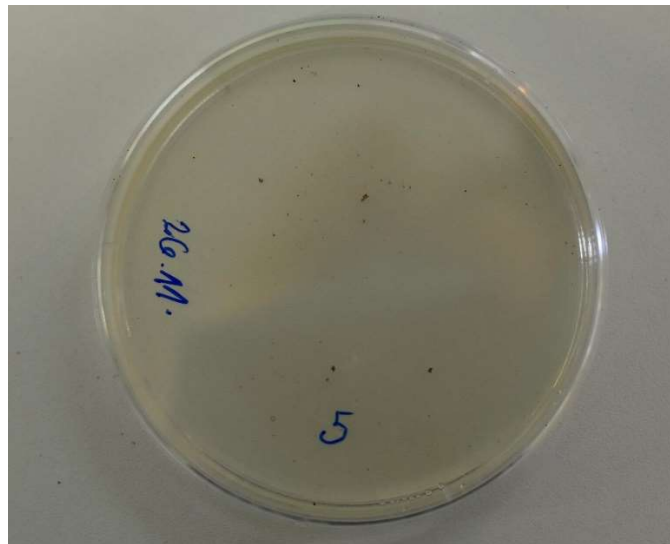


Slika 5. Uzorak grane zaražen gljivom *Cryphonectria parasitica*



Slika 6. Uzorci grana zaraženih gljivom *Cryphonectria parasitica*

U svaku Petrijevu zdjelicu stavljena su 4 komadića strome promjera oko 1,5 mm. Komadići su bili ravnomjerno raspoređeni po Petrijevoj zdjelici (Slika 7). Pri završetku izolacije Petrijeve zdjelice stavljene su u plastičnu vrećicu koja je zatvorena kvačicom i odložena na inkubaciju u komoru rasta u kontrolirane uvjete na temperaturu od 24 ± 1 °C.



Slika 7. Komadići strome gljive *Cryphonectria parasitica* pravilno raspoređeni u Petrijevoj zdjelici

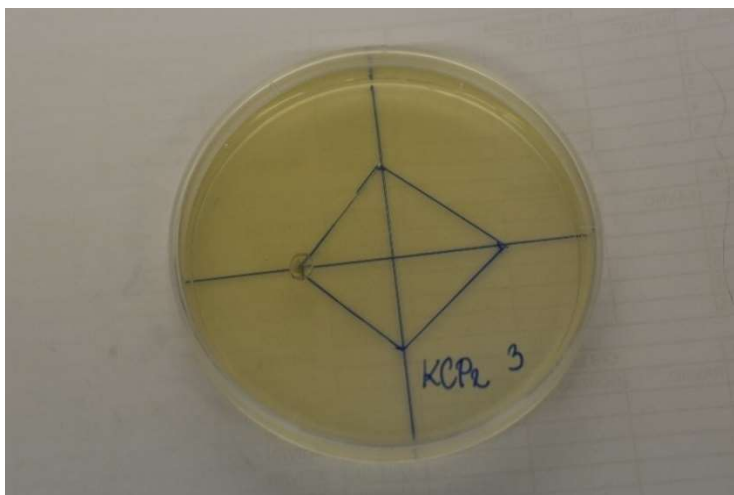
Četiri dana nakon izolacije, kada su miceliji gljive *Cryphonectria parasitica* narasli do određene veličine, u laminarnom kabinetu u sterilnim uvjetima vršena je presadnja micelija u Petrijeve zdjelice (promjera 6 cm) na PDA hranjive podloge kako bi dobili čiste kulture za daljnju laboratorijsku analizu. Presadnja je vršena pomoću skalpela steriliziranog otopinom 96%-tnog etanola i kratkim držanjem na plamenu. Prilikom svake

nove presadnje skalpel je steriliziran na isti način. Za presadnju korišteni su komadići micelija dimenzija 5x5 mm, sa rubova rasta micelija jer se na tom dijelu nalaze najmlađe hife, te su odloženi na sredinu Petrijeve zdjelice sa gornjim dijelom okrenutim prema dolje (gornji dio uzorka na kojem se nalazio micelij dodirivao je gornji dio hranjive podloge) kako bi se osigurao bolji rast micelija. Svaka Petrijeva zdjelica označena je rednim brojem klona sa kojeg je vršena presadnja. Nakon završene presadnje Petrijeve zdjelice posložene su u plastične vrećice te su stavljene u komoru rasta na temperaturu od 24 ± 1 °C.

Izolacijom patogena *Cryphonectria parasitica* dobivene su tri čiste kulture, CP1, CP2 i CP3 koje su korištene za postavljanje dvojnih kultura.

3.1 Priprema dvojnih kultura

Pripremljeno je 55 Petrijevih zdjelica sa PDA hranjivom podlogom. Na sredini donje strane Petrijeve zdjelice pomoću markera iscrtana je crta koja zdjelicu dijeli na pola. Petrijeva zdjelica promjera je 8,4 cm te je crta smještena na pola, odnosno na 4,2 cm. Okomito na vodoravnu crtu iscrtana je crta pa te dvije crte čine križ. Od sredine iscrtan je pravilni četverokut koji je dobiven određivanjem iste udaljenosti na sva četiri pravca te spajanjem tih točaka. Gornji dio Petrijeve zdjelice označen je slovom "G", što predstavlja rast gljive prema gore a donji dio slovom "D", što predstavlja rast gljive prema dolje (Slika 8). Mjerenje rasta izolata micelija vršeno je 25.1.2021. i 27.1.2021. godine pomoću školskog ravnala u centimetrima, na način da je mjeren ukupan rast micelija u tri smjera: horizontalno, prema gore pod kutem od 45 °, te prema dolje pod kutem od 45 °.



Slika 8. Oznake na poleđini Petrijevih zdjelica pripremljenih za mjerenje rasta micelija

Presadivanje izolata *Cryphonectria parasitica* i *Trichoderma tomentosum* na pripremljene Petrijeve zdjelice izvršeno je u laminarnom mikrobiološkom kabinetu 21.1.2021. godine. Za presađivanje korišteni su skalpel i pinceta koji su sterilizirani etanolom i plamenom između svakog novog uzimanja micelija. Komadići micelija promjera oko 2 mm, uzeti s rubova aktivnih micelija starih sedam dana su postavljeni u dvojne kulture na međusobnu udaljenost od približno 4,2 cm. U kontrolnim kulturama su miceliji svih pet izolata korištenih u istraživanju suprotstavljeni čepovima čiste sterilne hranjive podloge. Kombinacije izolata u dvojnim kulturama te broj repeticija dvojnih i kontrolnih kultura su prikazani u Tablici 1.

Tablica 1. Broj Petrijevih zdjelica s dvojnim i kontrolnim kulturama i popis suprotstavljenih micelija

Oznaka petrijeve zdjelice	Dvojna ili kontrolna kultura	Broj Petrijevih zdjelica
CP1 + TT42	<i>C.parasitica</i> + <i>T.tomentosum</i> (CP1+TT42)	5
CP1 + TT43	<i>C. parasitica</i> + <i>T.tomentosum</i> (CP1+TT43)	5
CP1 K	<i>C. parasitica</i> kontrola (CP1 K)	5
CP2 + TT42	<i>C.parasitica</i> + <i>T.tomentosum</i> (CP2+TT42)	5
CP2 + TT43	<i>C.parasitica</i> + <i>T.tomentosum</i> (CP2+TT43)	5
CP2 K	<i>C.parasitica</i> kontrola (CP2 K)	5
CP3 + TT42	<i>C.parasitica</i> + <i>T.tomentosum</i> (CP3+TT42)	5
CP3 + TT43	<i>C.parasitica</i> + <i>T.tomentosum</i> (CP3+TT43)	5
CP3 K	<i>C.parasitica</i> kontrola (CP3 K)	5
K TT42	<i>T. tomentosum</i> kontrola (K TT42)	5
K TT43	<i>T. tomentosum</i> kontrola (K TT43)	5

4. REZULTATI

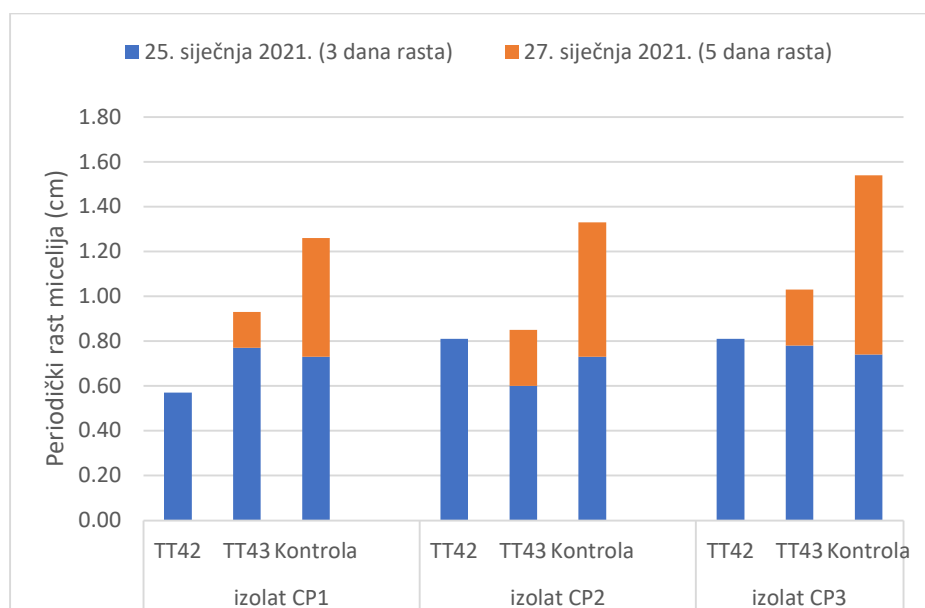
U ovom poglavlju biti će prikazani rezultati istraživanja dobiveni nakon laboratorijskih postupaka. Ukupni broj Petrijevih zdjelica sa izolatima iznosio je 55 od čega je 25 Petrijevih zdjelica bilo kontrolnih, a u ostalih 30 Petrijevih zdjelica nalazile su se dvojne kulture. Ukupni prosječni rast izolata *T. tomentosum* iznosio je 3 cm, a izolata *C. parasitica* 0,73 cm (Tablica 2). Izolati *Trichoderma tomentosum* su u dvojnim kulturama prerasli izolate *C. parasitica* (Prilog 1: Slika 14 – Slika 46).

Tablica 2. Prikaz ukupnog prosječnog rasta izolata u dvojnim i kontrolnim kulturama

Dvojna kultura	Mjerenje 25.1.2021.	Dvojna kultura	Mjerenje 27.1.2021.
CP1 vs. TT42	0.57	CP1 vs. TT42	0.00
CP1 vs. TT43	0.78	CP1 vs. TT43	0.16
CP1 vs. TT42	4.11	CP1 vs. TT42	4.29
CP1 vs. TT43	2.25	CP1 vs. TT43	2.42
CP2 vs. TT42	0,81	CP2 vs. TT42	0.00
CP2 vs. TT43	0.60	CP2 vs. TT43	0.25
CP2 vs. TT42	3.75	CP2 vs. TT42	4.65
CP2 vs. TT43	2.24	CP2 vs. TT43	1.94
CP3 vs. TT42	0.81	CP3 vs. TT42	0.00
CP3 vs. TT43	0.78	CP3 vs. TT43	0.25
CP3 vs. TT42	3.71	CP3 vs. TT42	4.69
CP3 vs. TT43	2.17	CP3 vs. TT43	2.25
CP1 kontrola	0.73	CP1 kontrola	0.53
CP2 kontrola	0.73	CP2 kontrola	0.60
CP3 kontrola	0.74	CP3 kontrola	0.80
TT42 kontrola	4.35	TT42 kontrola	4.05
TT43 kontrola	2.19	TT43 kontrola	2.37

* *Podebljani izolati mjereni su, mjere u desnom dijelu tablice predstavljaju rast podebljanog izolata.*

Izolati vrste *Cryphonectria parasitica* su ostvarili najveći rast u kontrolnim kulturama, a u dvojnim kulturama sa izolatom TT42 su prestali sa rastom između dva mjerenja (Slika 9).



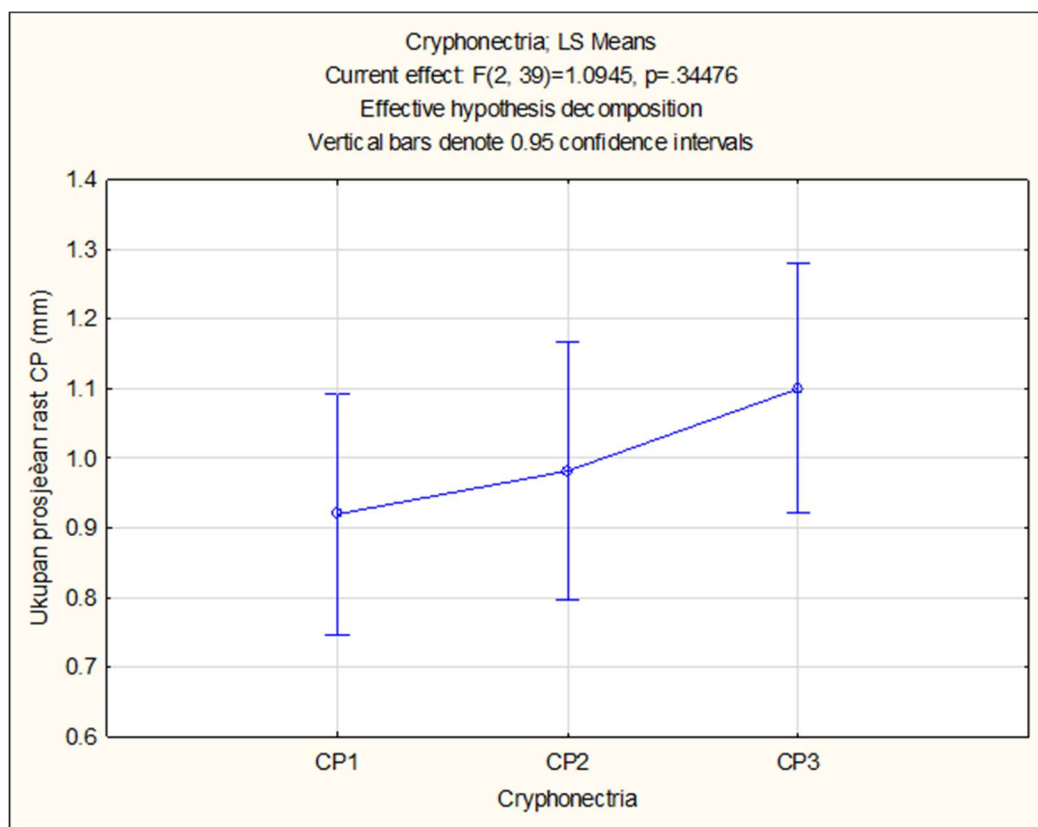
Slika 9. Grafikon rasta tri izolata vrste *Cryphonectria parasitica* (CP1, CP2 i CP3) u dvojnim kulturama sa dva izolata vrste *Trichoderma tomentosum* (TT42 i TT43) i u kontrolnim kulturama

4.1 Varijabilnost u rastu korištenih izolata patogene i antagonističke gljive

Nakon izvršena dva mjerenja rasta izolata *Cryphonectria parasitica* test homogenosti pokazao je da su varijance u rastu različitih izolata homogene ($p = 0,302$) (Tablica 3), zbog čega je u daljnjoj analizi korišten parametrijski One-way ANOVA test za usporedbu ukupnog prosječnog rasta različitih izolata gljive *Cryphonectria parasitica*. Navedeni test je pokazao kako nema statistički značajne razlike u rastu između izolata CP1, CP2 i CP3, što je dodatno potvrđeno Fischerovim LSD *post hoc* testom (Tablica 4).

Tablica 3. Rezultati testa homogenosti varijanci za rast izolata *Cryphonectria parasitica* u različitim tipovima dvojnih kultura.

Tests of Homogeneity of Variances, Effect: "Cryphonectria"					
	Hartley	Cochran	Bartlett	Df	p
Ukupan prosječan rast CP (mm)	2.402014	0.498754	0.302255	2	0.302255



Slika 10. Međusobna usporedba rasta različitih izolata gljive *Cryphonectria parasitica*

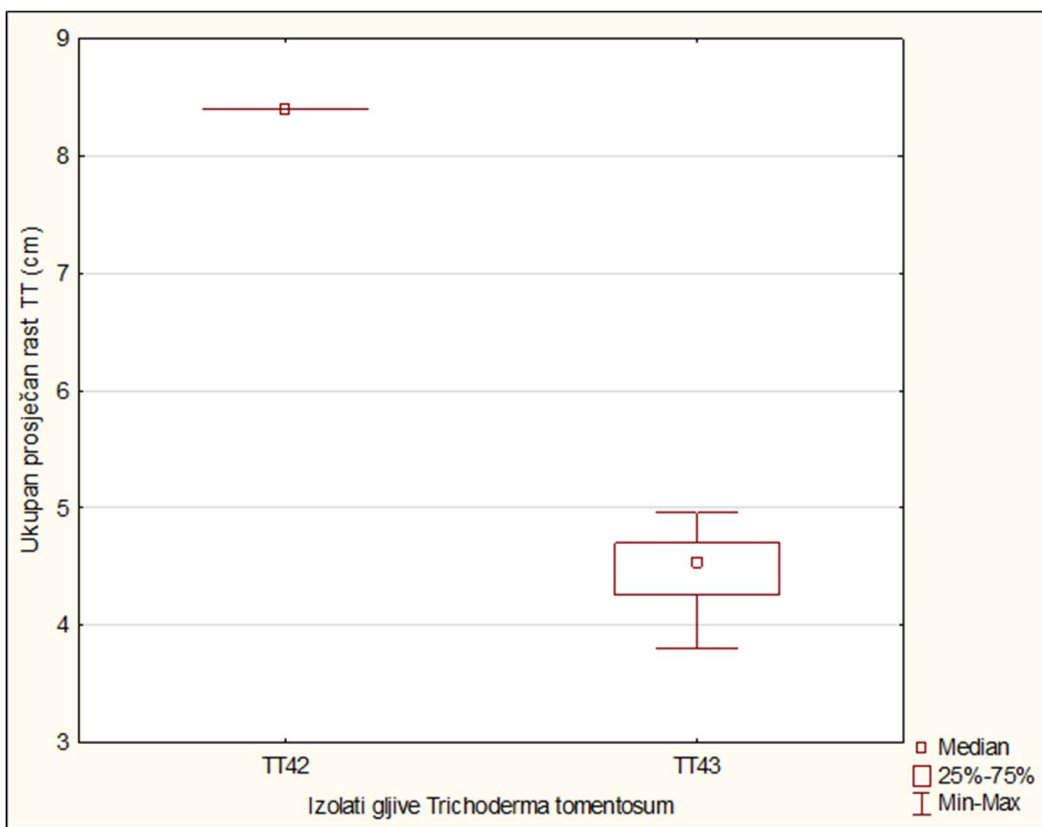
Tablica 4. Rezultati Fischerovog LSD testa za rast izolata *Cryphonectria parasitica* u različitim tipovima dvojnih kultura.

Post-hoc Fischer LSD test; ukupan prosječan rast CP			
<i>Cryphonectria parasitica</i>	CP1	CP2	CP3
CP1		0,623808	0,151650
CP2	0,623808		0,360893
CP3	0,151650	0,360893	

Nakon izvršena dva mjerenja rasta izolata *Trichoderma tomentosum* Levenov test je pokazao kako varijance u rastu različitih izolata nisu homogene ($p < 0,001$), stoga je za daljnju analizu korišten neparametrijski Mann-Whitney U test, koji je pokazao kako postoji statistički značajna razlika u rastu između izolata TT42 i TT43 ($p < 0,001$) (Tablica 5, Slika 11).

Tablica 5. Rezultati Mann-Whitney U testa za rast izolata *Trichoderma tomentosum* u različitim tipovima dvojnih kultura

Mann-Whitney U test										
Variable	Rank sum	Rank sum	U	Z	P-value	Z	p-value	Valid-N	Valid- N	2*1 sided
Ukupan prosječan rast TT (cm)	550.00 0	153.00 0	0.0 0	5.16569 9	0.0	5.62879 3	0.0	20	17	0.0



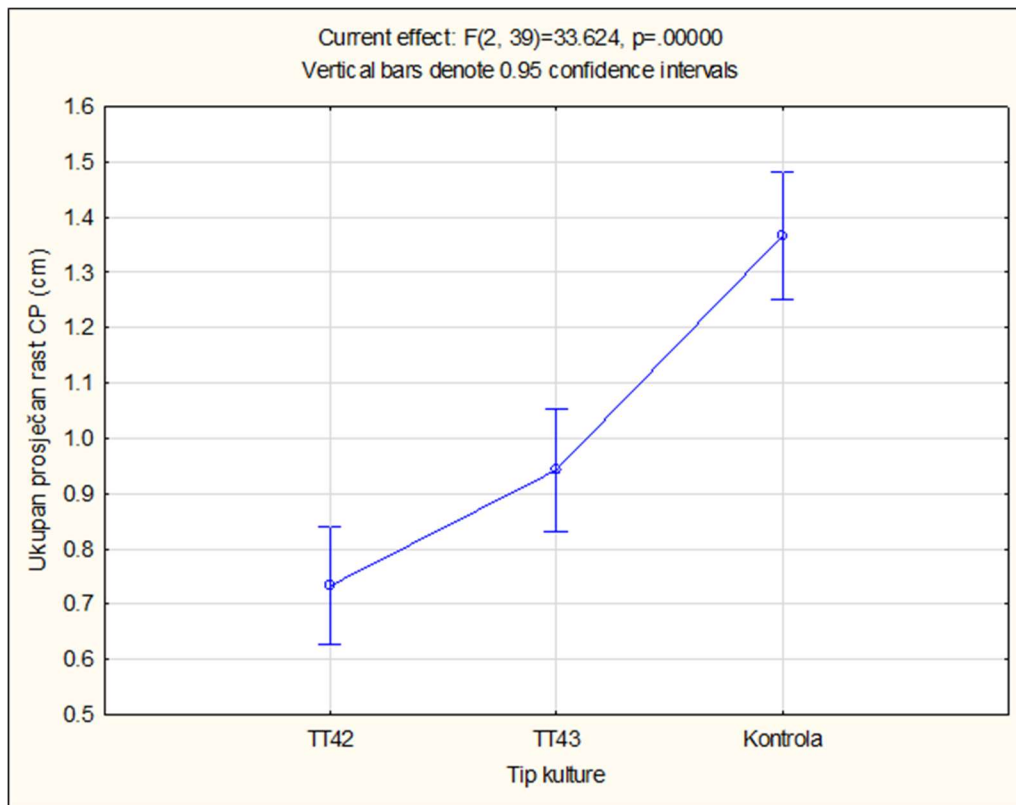
Slika 11. Usporedba rasta različitih izolata gljive *Trichoderma tomentosum*

4.2 Utjecaj antagonističke gljive na rast patogena *C. parasitica*

One-way ANOVA test je pokazao kako postoji statistički značajna razlika u rastu gljive *Cryphonectria parasitica* s obzirom na suprotstavljeni izolat gljive *Trichoderma tomentosum*, odnosno tip kulture ($p < 0,001$). Fisher LSD *post-hoc* test je pokazao značajnu razliku u rastu između izolata *Cryphonectria parasitica* u dvojnim kulturama i onih u kontrolnim kulturama (Tablica 6). Isto tako, pokazao je značajnu razliku u rastu izolata *Cryphonectria parasitica* suprotstavljenih izolatu TT42 u odnosu na one suprotstavljene izolatu TT43 (Tablica 6, Slika 12).

Tablica 6. . Rezultati Fischerovog LSD testa za rast patogene gljive *Cryphonectria parasitica* u različitim tipovima dvojnih kultura

LSD test; variable Ukupan prosječan rast CP			
Tip kulture	vs. TT42	vs. TT43	Kontrola
vs. TT42		0,009362	0,000000
vs. TT43	0,009362		0,000004
Kontrola	0,000000	0,000004	



Slika 12. Utjecaj tipa kulture (dvojna kultura sa *Trichoderma tomentosum*, kontrola) na rast gljive *Cryphonectria parasitica*

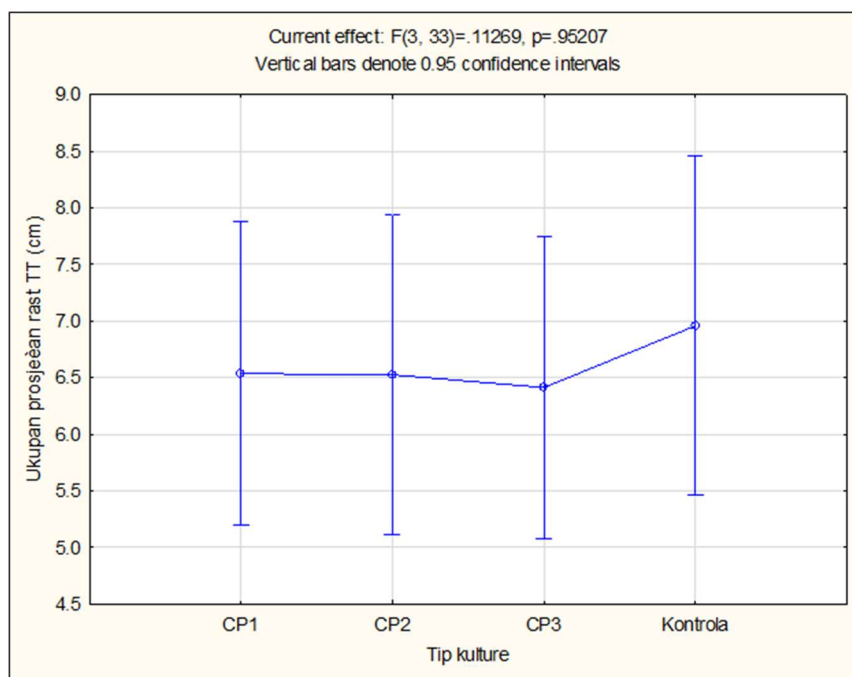
4.3 Utjecaj patogena *C. parasitica* na rast antagonističke gljive

Također, One-way ANOVA test je pokazao kako ne postoji statistički značajna razlika u rastu gljive *Trichoderma tomentosum* s obzirom na suprotstavljeni izolat gljive

Cryphonectria parasitica, odnosno tip kulture ($p = 0,952$), što je prikazano u Tablici 7 i vidljivo na slici 13.

Tablica 7. . Rezultati Fischerovog LSD testa za rast izolata *Trichoderma tomentosum* u različitim tipovima dvojnih kultura

LSD test, ukupan prosječan rast izolata gljive <i>Trichoderma tomentosum</i> (cm)				
Tip kulture	vs. CP1	vs. CP2	vs. CP3	Kontrola
vs. CP1		0,991101	0,895329	0,671890
vs. CP2	0,991101		0,906934	0,671566
vs. CP3	0,895329	0,906934		
Kontrola	0,671890	0,671566	0,584422	0,584422



Slika 13. Utjecaj tipa kulture (dvojne kulture sa tri izolata *C. parasitica*, kontrolne kulture) na rast gljive *Trichoderma tomentosum*

5. RASPRAVA I ZAKLJUČAK

Istraživanje je provedeno na tri izolata vrste *Cryphonectria parasitica* (CP1, CP2 i CP3) s ciljem ispitivanja utjecaja dva izolata vrste *Trichoderma tomentosum* (TT42 i TT43) na njihov rast u Petrijevim zdjelicama. Ovakva istraživanja su prvi korak u ispitivanju pogodnosti neke vrste gljive, u ovom slučaju vrste *Trichoderma tomentosum*, u biološkoj zaštiti.

Usporedbom ukupnog prosječnog rasta tri izolata vrste *Cryphonectria parasitica* (CP1, CP2 i CP3) vidi se da su svi izolati vrste *Cryphonectria parasitica* u prosjeku rasli jednakom brzinom, što pokazuje da nema visoke varijabilnosti u njihovom rastu te ako vrsta *Trichoderma tomentosum* pokaže inhibirajuće djelovanje na izolate patogene gljive veća je vjerojatnost da će djelovati i na druge izolate nego kada bi postojala visoka varijabilnost u njihovom rastu. Što se tiče suprotstavljene antagonističke gljive, izolat TT42 vrste *Trichoderma tomentosum* rastao je značajno brže u odnosu na izolat TT43 te je u kraćem vremenu prerastao Petrijevu zdjelicu u potpunosti i time prije zaustavio rast izolata vrste *Cryphonectria parasitica*. Iz toga je vidljivo da izolat TT42 pokazuje jače inhibitorno djelovanje u odnosu na izolat TT43.

ONE-way ANOVA test je pokazao kako postoji statistički značajna razlika u rastu gljive *Cryphonectria parasitica* s obzirom na suprotstavljeni izolat gljive *Trichoderma tomentosum*. Izolati vrste *Cryphonectria parasitica* u kontrolnim kulturama brže su rasli nego kada su bili postavljeni u dvojnoj kulturi sa izolatom vrste *Trichoderma tomentosum*. Ovi rezultati upućuju da izolat vrste *Trichoderma tomentosum* značajno utječe na rast izolata vrste *Cryphonectria parasitica*. To je potvrdio i Fischer LSD post-hoc test.

Cryphonectria parasitica u dvojnim kulturama sa izolatom TT42 rasla je sporije nego u dvojnim kulturama sa izolatom TT43. Navedeno ukazuje na moguće jače inhibirajuće djelovanje izolata TT42 u odnosu na izolat TT43, što se poklapa sa činjenicom kako je izolat TT42 pokazao značajno brži rast u odnosu na izolat TT43.

Iako je prema rezultatima testova *Trichoderma tomentosum* značajno utjecala na rast vrste *Cryphonectria parasitica*, do obrnutog utjecaja nije došlo, odnosno One-way ANOVA test je pokazao da ne postoji statistički značajna razlika u rastu izolata

Trichoderma tomentosum s obzirom na suprotstavljeni izolat *Cryphonectria parasitica*. To je bilo očekivano s obzirom na to da vrste roda *Trichoderma* pokazuju inhibitorno djelovanje na ostale gljive i imaju svojstvo brzog rasta u kulturama.

Zaključno možemo reći da dva izolata vrste *Trichoderma tomentosum* značajno utječu na rast izolata vrste *Cryphonectria parasitica*. *Trichoderma tomentosum* rastom micelija inhibirala je rast micelija vrste *Cryphonectria parasitica*. Pokazalo se kako od dva izolata vrste *Trichoderma tomentosum* jedan ima jače djelovanje (TT42) što je vidljivo po tome što je izolat TT42 bio bržeg rasta u odnosu na izolat TT43. Pokazalo se da su izolati vrste *Cryphonectria parasitica* u Petrijevim zdjelicama rasli sve dok se izolat vrste *Trichoderma tomentosum* nije dotakao rub rasta izolata vrste *Cryphonectria parasitica*. Nakon što je u Petrijeve zdjelice sa izolatom vrste *Cryphonectria parasitica* postavljen izolat vrste *Trichoderma tomentosum*, *Cryphonectria parasitica* nastavlja rasti još nekoliko dana ali sve sporijim intenzitetom sve dok njen rast nije u potpunosti zaustavljen nakon čega je *Trichoderma tomentosum* u potpunosti prerasla Petrijevu zdjelicu.

Zaključno, u razdoblju između prvog i drugog mjerenja izolat TT42 inhibirao je rast izolata gljive *C. parasitica* (CP1, CP2 i CP3), a izolati TT43 inhibirao je rast gljive *C. parasitica* nakon drugog mjerenja prema čemu možemo zaključiti da vrsta *T. tomentosum* u *in vitro* uvjetima može inhibirati rast navedenog patogena.

Trichoderma tomentosum ima potencijal za korištenje u biološkoj kontroli bolesti uzrokovane vrstom *Cryphonectria parasitica*, međutim, potrebno je provesti još niz dodatnih istraživanja kako bi se njen učinak detaljnije opisao. Jedno od mogućih istraživanja bila bi aplikacija vrste *Trichoderma tomentosum* u stabla zaražena vrstom *Cryphonectria parasitica* što bi omogućilo konkretan uvid u učinak vrste *Trichoderma tomentosum* na zaraženim stablima u prirodnim uvjetima.

Zbog sve veće osviještenosti o negativnim utjecajima kemijskih sredstava na okoliš sve je veći interes za upotrebu bioloških sredstava za zaštitu. Antagonistički organizmi nemaju negativno djelovanje na okoliš ni na ljude zato što proizvode minimalnu količinu toksičnih ostataka te svojim ciljanim djelovanjem ne utječu na čitavi ekosustav što je slučaj kod kemijskih sredstava. Duljom upotrebom kemijskih sredstava biljke pokazuju rezistentnost na aktivnu tvar što se kod bioloških sredstava ne događa.

Upotreba antagonističkih gljiva i bakterija predstavlja dobru alternativu kemijskim pesticidima. Sve više bi trebalo težiti smanjivanju upotrebe kemijskih pesticida koji negativno utječu na čitav ekosustav, a poticati upotrebu bioloških sredstava.

6. LITERATURA

- 1) Adamcikova, K., Kobza, M., Juhasova, G., 2010: Characteristics of the *Cryphonectria parasitica* isolated from *Quercus* in Slovakia. Forest Pathology, br. 40, str. 443-449.
- 2) Benitez, T., Rincon, A.M., Limcon, M.C., Codon, A.C., 2004: Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology, br. 7, str. 249-260.
- 3) Bernardinelli, I., 2001: Distribution of the Oak lace bug *Corythucha arcuata* Say in northern Italy (*Heteroptera Tingidae*), 83, str. 157-162.
- 4) Bissegger, M., Heiniger, U., 1991: Chestnut blight (*Cryphonectria parasitica*) north of the Swiss Alps. European Journal of Forest Pathology, br. 21, str. 250-252.
- 5) Chen, L., Boka, B., Kedves, O., Nagy, V.D., Szucs, A., Champramary, S., Roszik, R., Patocskai, Z., Munsterkotter, M., Huynh, T., Indic, B., Vagvolgyi, C., Sipos, G., Kredics, L., 2019: Towards biological control of devastating forest pathogens from the genus *Armillaria*. Forests, br. 10, str. 1013.
- 6) Diller, J.D., 1965: Chestnut Blight. Forest Pest Leaflet 94. U.S. Department of Agriculture Forest Service, Washington, str. 7.
- 7) 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 resources, green technology and sustainable development, GREEN/3, str. 161-165.
- 8) Franjić, J., Škvorc, Ž., 2017: Šumsko drveće i grmlje Hrvatske. Šumarski fakultet, Zagreb, str. 292.
- 9) Fravel, D., Olivain, C., Alabouvette, C., 2003: *Fusarium oxysporum* and its biocontrol, New Phytologist, br. 157, str. 493-502.
- 10) Glavaš, M., 1999: Gljivične bolesti šumskoga drveća. Šumarski fakultet, Zagreb, str. 78-88.
- 11) Glavaš, M., 2011: Zaštita hrastovih sastojina od pepelnice (*Microsphaera alphitoides* Griff. et Maubl.). Croatian Journal of Forest Engineering 32, str. 205 – 210.

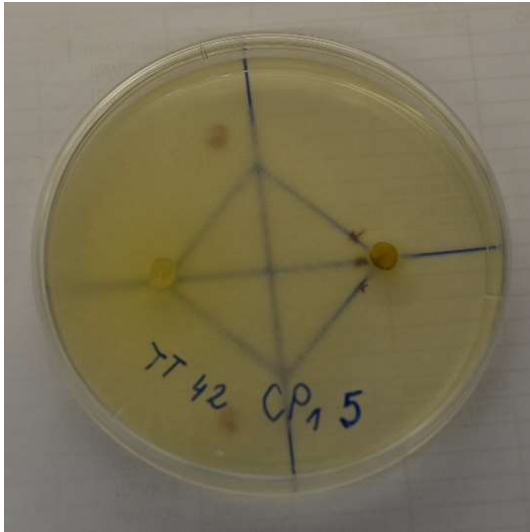
- 12) Gobbin, D., Hoegger P.J., Heiniger U., Rigling D., 2003: Sequence variation and evolution of *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV-1) in Europe. *Virus Research* 97, str. 39–46.
- 13) Gobbin, D., Hoegger, P.J., Heiniger, U., Rigling, D., 2003. Sequence variation and evolution of *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV-1) in Europe. *Virus Research* 97, str. 39–46.
- 14) Gonzales, Emily, Y., Ferguson, 1998: Evaluation of *Trichoderma autoviride* as a potential biocontrol agent of *Cryphonectria parasitica*. *Plant Pathology*.
- 15) Halambek, M., 1986: Chestnut blight in Yugoslavia. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 16, str. 533– 535.
- 16) Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M., 2004: *Trichoderma* species- Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, str. 43-56.
- 17) Heiniger U., Rigling D., 1994: Biological control of chestnut blight in Europe. *Annu Rev Phytopathol* 32, str. 581-599.
- 18) Heiniger, U., and Rigling, D., 1994: Biological control of chestnut blight in Europe. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32, 581–599.
- 19) Heiniger, U., Rigling D., 1994: Biological control of chestnut blight in Europe. *Annual Review of Phytopathology* 32, str. 581–599.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) Ilona, S., Szabolcs, V., Henriett, V., 2009: Occurrence, impact and control possibilities of *Cryphonectria parasitica* in sessile oak in Hungary. *Novenyvedelem*, br. 45, str. 208-212.
- 23) Kajba, D., Katičić I., Šumanovac, I., Žgela, M. 2009: Sjeminarstvo i očuvanje genofonda. *Rad. Hrvat. Šumar. inst.* 44 (1), str. 37–52.
- 24) Kajba, D., Pavičić, N., Bogdan, S., Katičić, I., 2007: Pomotehnički zahvati u klonskim sjemenskim plantažama listača. *Šumarski list*, br. 11-12, str. 523-528.

- 25)Krstin L., 2009: Genska varijabilnost hipovirusa na području Hrvatske. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, doktorska disertacija
- 26)Krstin Lj., Novak-Agaba 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 Pathol 57(6), str.1086- 1096.
- 27)López-Bucio, J., Pelagio-Flores, R., Herrera-Estrella, A., 2015: *Trichoderma* as biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. Sci.Hortic, br.196, str. 109–123.
- 28)Moraga-Suazo, P., Opazo, A., Zaldua, S., Gonzales, G., Sanfuentes, E., 2011: Evaluation of *Trichoderma* spp. and *Clonostachys* spp. strains to control *Fusarium circinatum* in *Pinus Radiata* seedlings. Chilean JAR 71, str. 412-417.
- 29)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.
- 30)Pal, K.K., McSpadden Gardener, B., 2006: Biological control of plant Pathogens. The plant health instructor, br 10, str. 1117-02.
- 31)Perlerou, C., Diamandis, S., 2006: Identification and geographic distribution of vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* and occurrence of hypovirulence in Greece. For Pathol, br. 36, str. 413–421.
- 32)Petračić, A., 1909: Oidium na hrastovim šumama. Šumarski list, br. 12, str. 441-445.
- 33)Prospero S., Lutz A., Tavadze B., Supatashvili A., Rigling D., 2013: Discovery of a new gene pool and a high genetic diversity of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* in Caucasian Georgia. Infection Genetics and Evolution 20, str. 131 – 139.
- 34)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.
- 35)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.

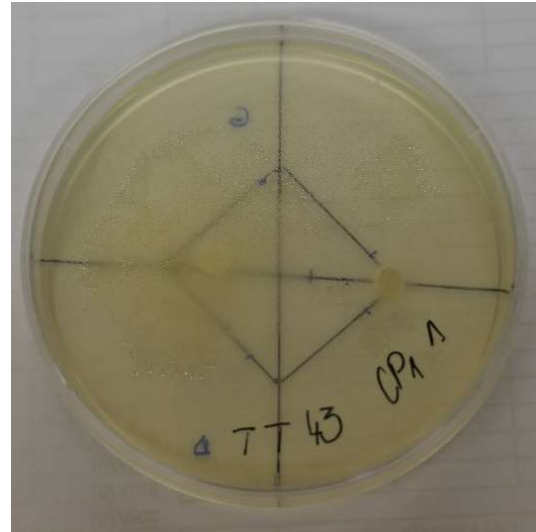
- 36) Reglinski, T., Dick, M., 2005: Biocontrol of forest nursery pathogens. N. Z. J., br. 50., str. 19-56.
- 37) Robin, C., Heiniger, U., 2001: Chestnut blight in Europe: diversity of *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence and biocontrol. Forest Snow and Landscape Research 76, str. 361–367.
- 38) Sharma, N., 2014: Biological Controls for Preventing Food Deterioration: Strategies for Pre-and Postharvest Management. University of Lucknow, India: Wiley-Blackwell
- 39) Tomić, I., 2012: Kontrolirana proizvodnja kitnjakovog žira za rasadnik Hajderovac. Hrvatske šume, br. 181/182, str. 4-7.
- 40) Topolovec-Pintarić, S., 2019: *Trichoderma*: Invisible Partner for Visible Impact in Agriculture. U: Trichoderma: The most widely used Fungicide. (ur. Shah M.M. Sharif U., Buhari T.R.), IntechOpen, London, str. 15-35.
- 41) 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.
- 42) Vukelić, J., 2012: Šumska vegetacija Hrvatske, Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb, str. 195-202.

7. PRILOZI

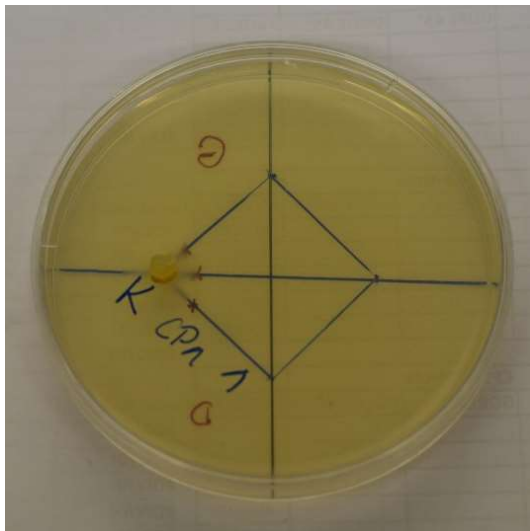
Prilog 1. Izgled micelija *Cryphonectria parasitica* i *Trichoderma tomentosum* u kontrolnim i dvojnim kulturama.



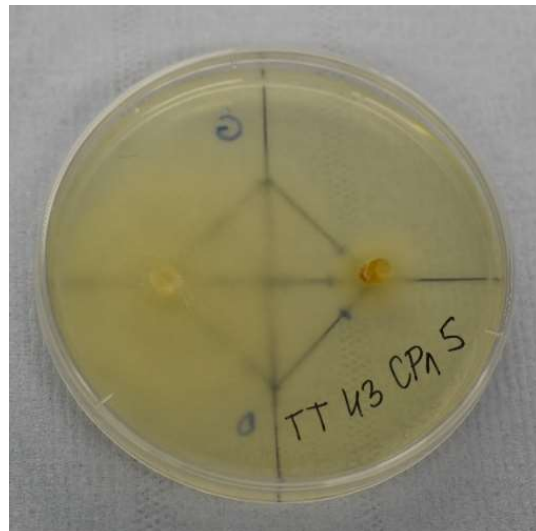
Slika 14. Izolat CP1 suprotstavljen izolatu TT42, prvo mjerenje, 25.1.2021. god.



Slika 15. Izolat CP1 suprotstavljen izolatu TT43, prvo mjerenje, 25.1.2021. god.



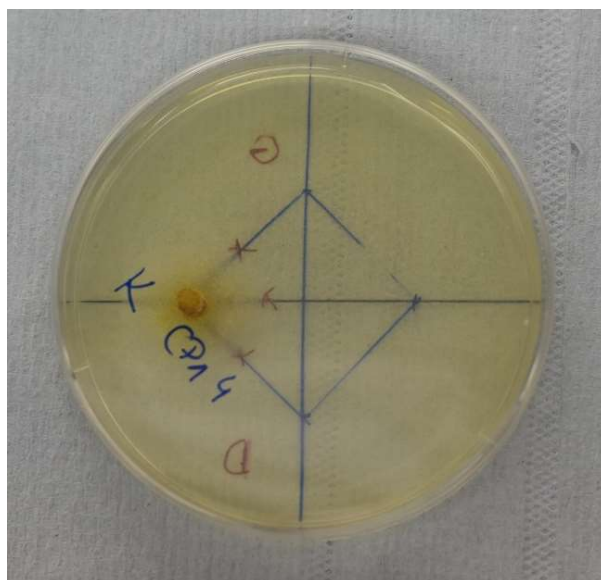
Slika 16. Kontrolna Petrijeva zdjelica sa izolatom CP1, prvo mjerenje, 25.1.2021. god.



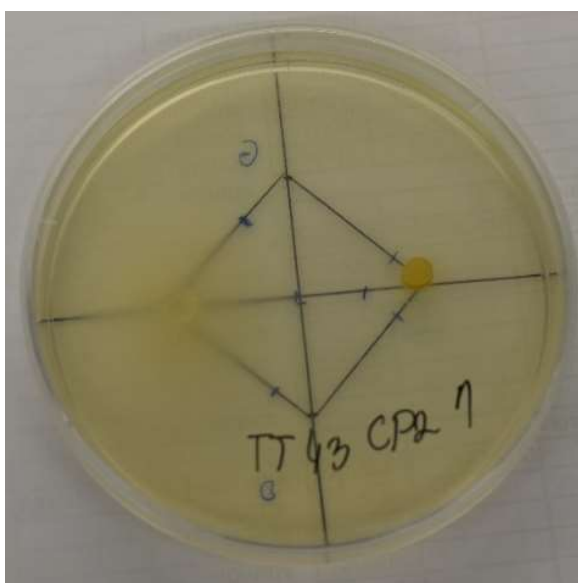
Slika 17. Izolat CP1 suprotstavljen izolatu TT42, drugo mjerenje, 27.1.2021.g.



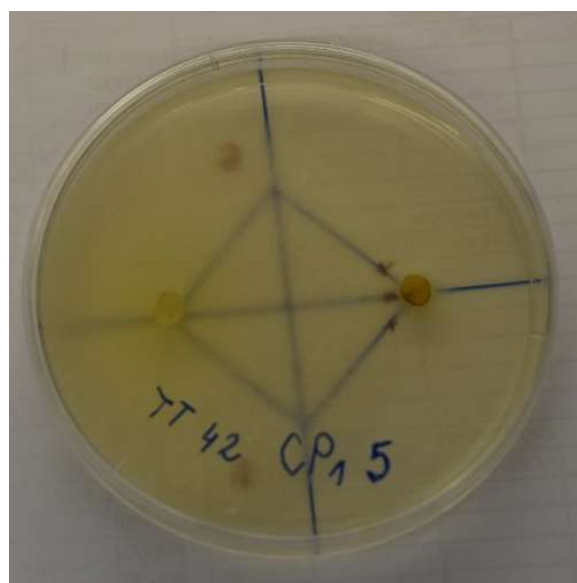
Slika 18. Izolat CP1 suprotstavljen izolatu TT43, drugo mjerenje, 27.1.2021. god.



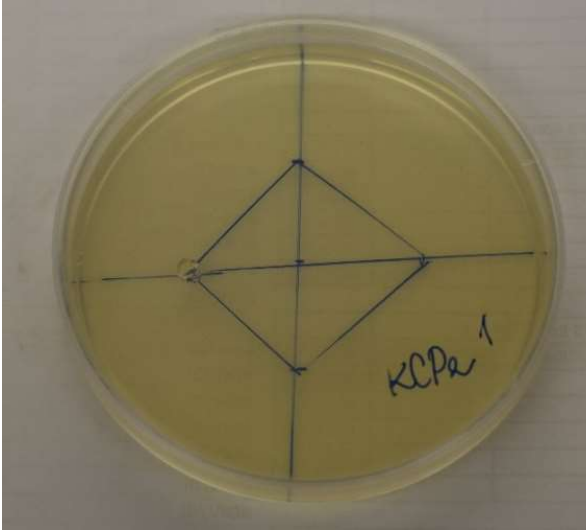
Slika 19. Kontrolna Petrijeva zdjelica sa izolatom CP1, drugo mjerenje, 27.1.2021. god.



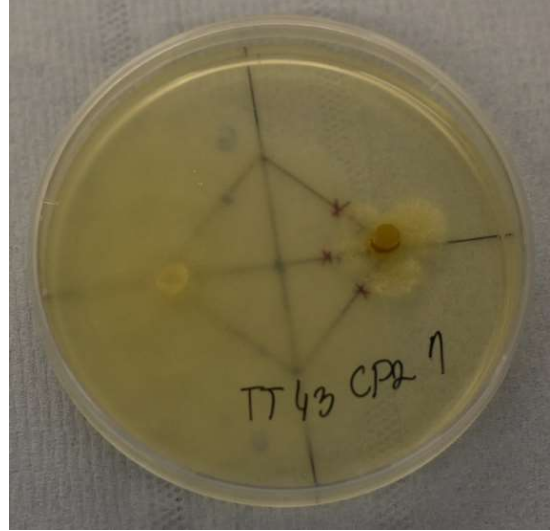
Slika 20. Izolat CP2 suprotstavljen izolatu TT43, prvo mjerenje, 25.1.2021. god.



Slika 21. Izolat CP1 suprotstavljen izolatu TT42, prvo mjerenje, 25.1.2021. god.



Slika 22. Kontrolna Petrijeva zdjelica sa izolatom CP2, prvo mjerenje, 25.1.2021. god.



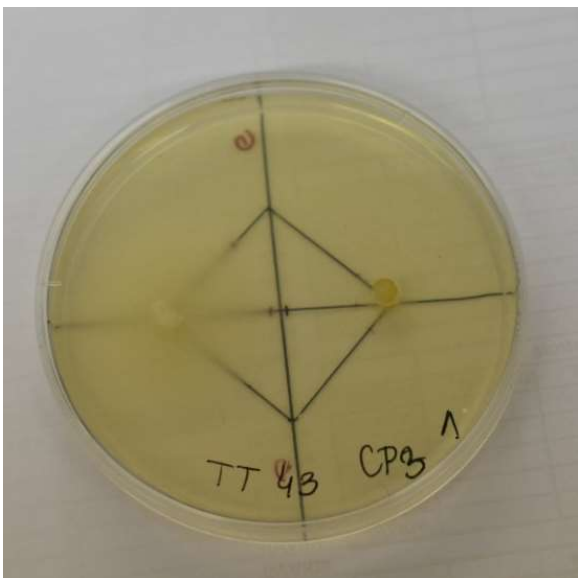
Slika 23. Izolat CP2 suprotstavljen sa izolatom TT43, drugo mjerenje, 27.1.2021. god.



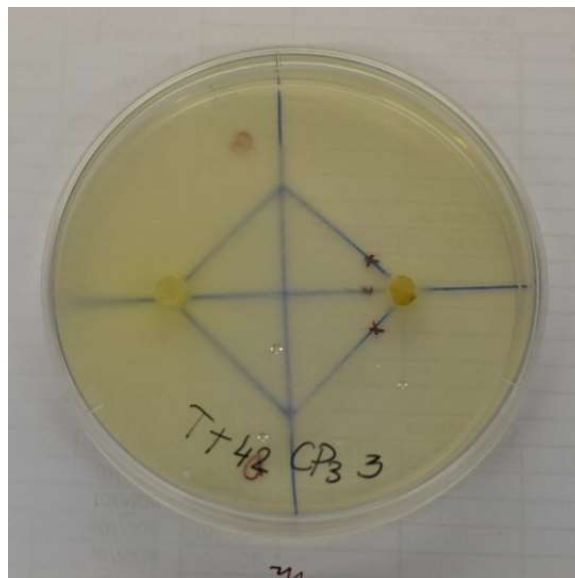
Slika 24. Izolat CP2 suprotstavljen sa izolatom TT42, drugo mjerenje, 27.1.2021. god.



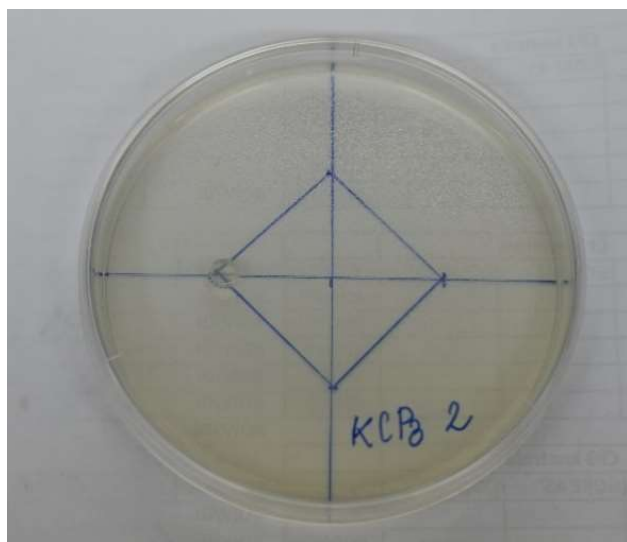
Slika 25. Kontrolna Petrijeva zdjelica sa izolatom CP2, mjerenje 27.1.2021. god.



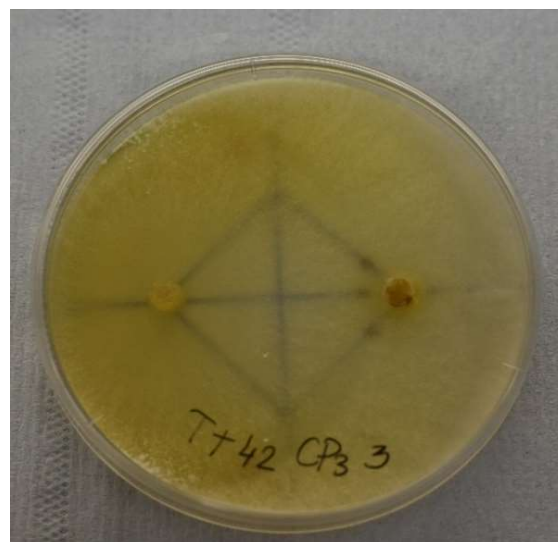
Slika 26. Izolat CP3 suprotstavljen sa izolatom TT43, prvo mjerenje 25.1.2021. god.



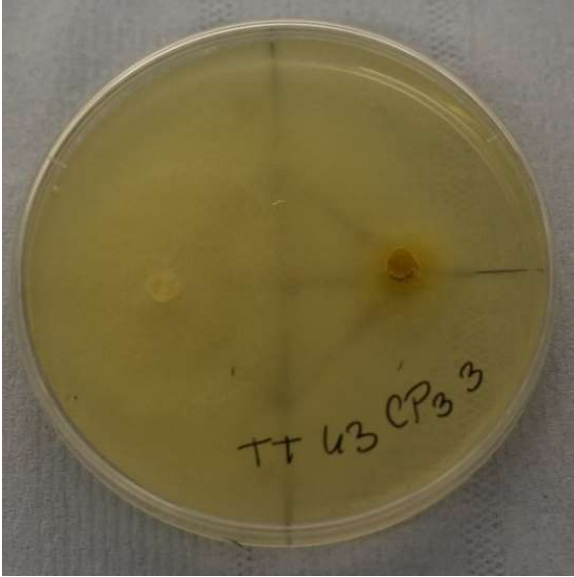
Slika 27. Izolat CP3 suprotstavljen sa izolatom TT42, prvo mjerenje, 25.1.2021. god.



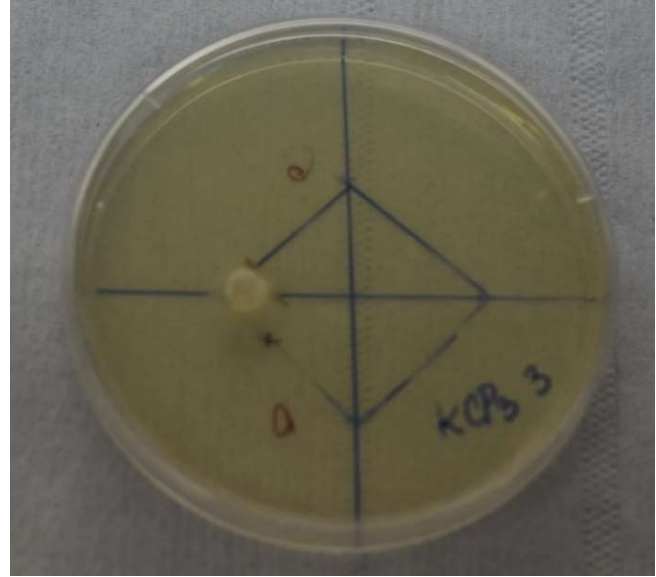
Slika 28. Kontrolna Petrijeva zdjelica sa izolatom CP3, prvo mjerenje, 25.1.2021. god.



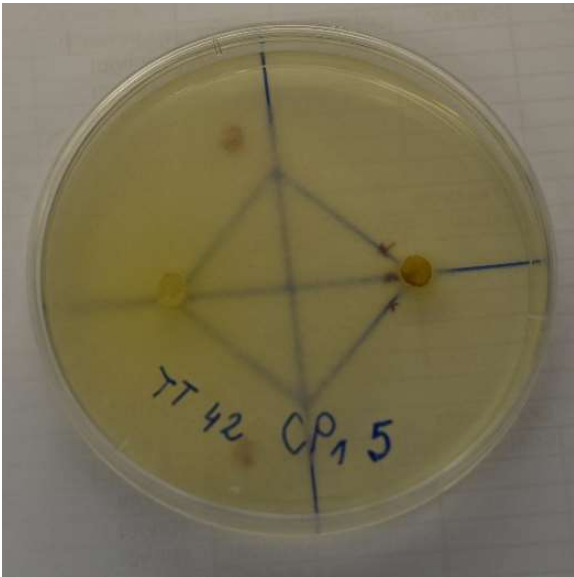
Slika 29. Izolat CP3 suprotstavljen sa izolatom TT42, drugo mjerenje, 27.1.2021. god.



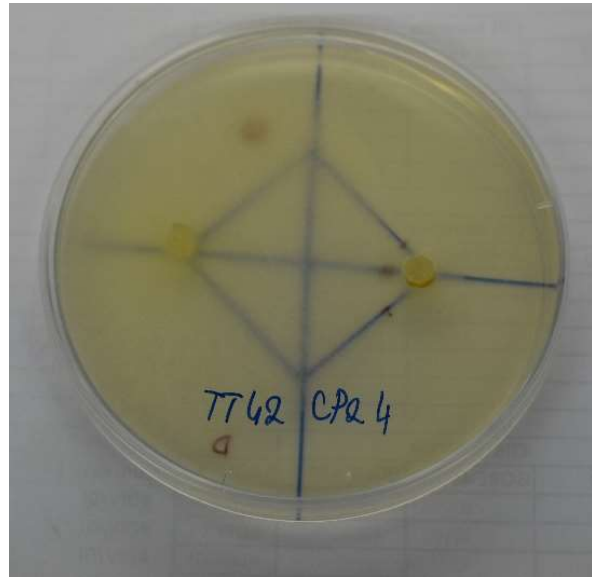
Slika 30. Izolat CP3 suprotstavljen sa izolatom TT43, drugo mjerenje, 27.1.2021. god.



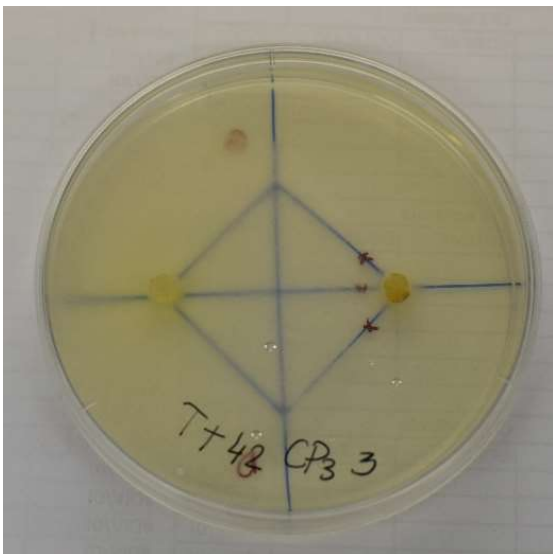
Slika 31. Kontrolna Petrijeva zdjelica sa izolatom CP3, drugo mjerenje, 27.1.2021. god.



Slika 32. Izolat CP1 suprotstavljen sa izolatom TT42, drugo mjerenje, 27.1.2021.god



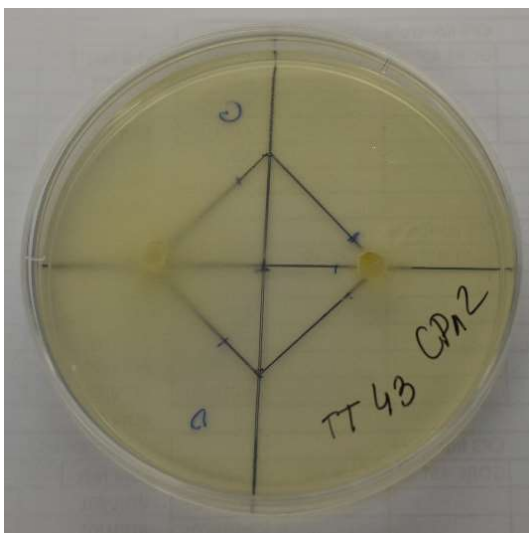
Slika 33. Izolat CP2 suprotstavljen sa izolatom TT42, drugo mjerenje, 27.1.2021. god



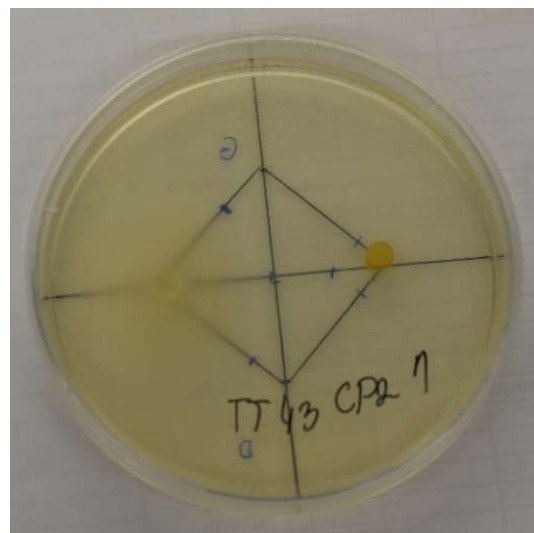
Slika 34. Izolat CP3 suprotstavljen sa izolatom TT42, drugo mjerenje, 27.1.2021. god.



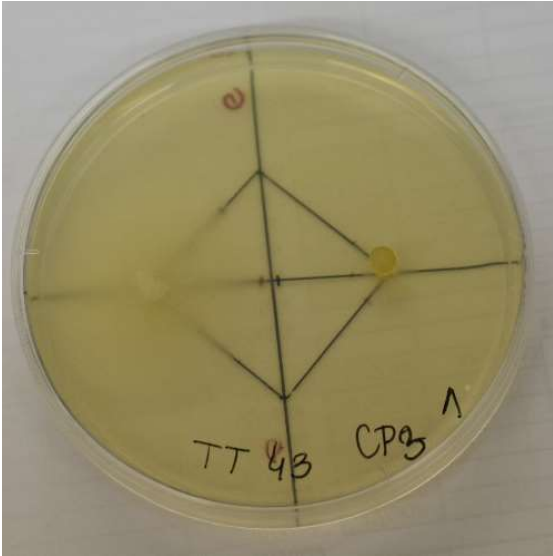
Slika 35. Kontrolna Petrijeva zdjelica sa izolatom TT42, drugo mjerenje, 27.1.2021. god.



Slika 36. Izolat TT43 suprotstavljen sa izolatom CP1, prvo mjerenje, 25.1.2021. god.



Slika 37. Izolat TT43 suprotstavljen sa izolatom CP2, prvo mjerenje, 25.1.2021. god.



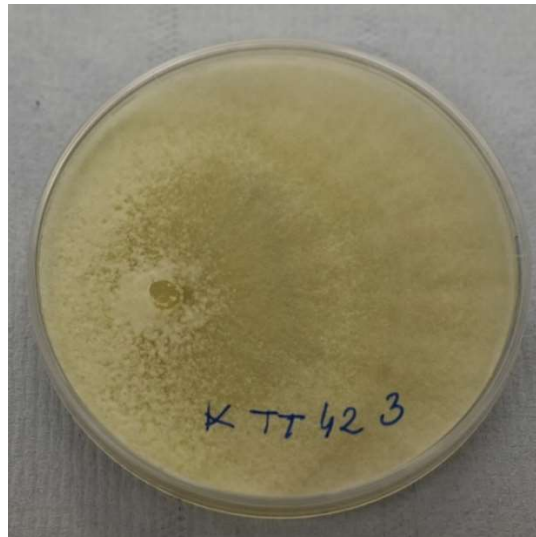
Slika 38. Izolat TT43 suprotstavljen sa izolatom CP3, prvo mjerenje, 25.1.2021. god



Slika 39. Kontrolna Petrijeva zdjelica sa izolatom TT43 prvo mjerenje, 25.1.2021. god.



Slika 40. Izolat TT42 suprotstavljen sa izolatom CP3, drugo mjerenje, 27.1.2021.god



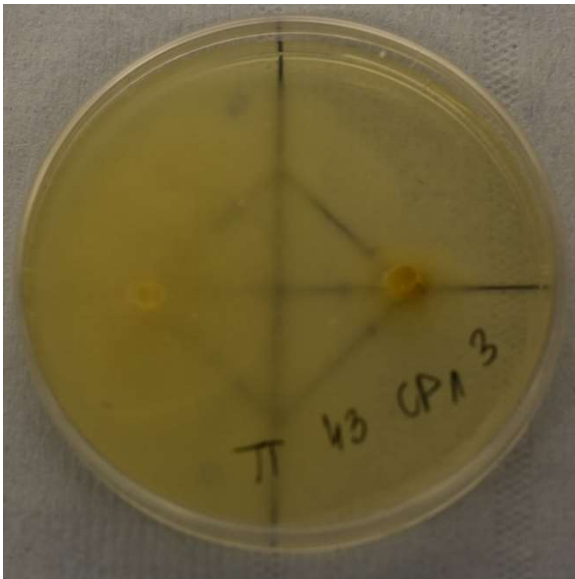
Slika 41. Kontrolna Petrijeva zdjelica sa izolatom TT42, drugo mjerenje, 27.1.2021.god.



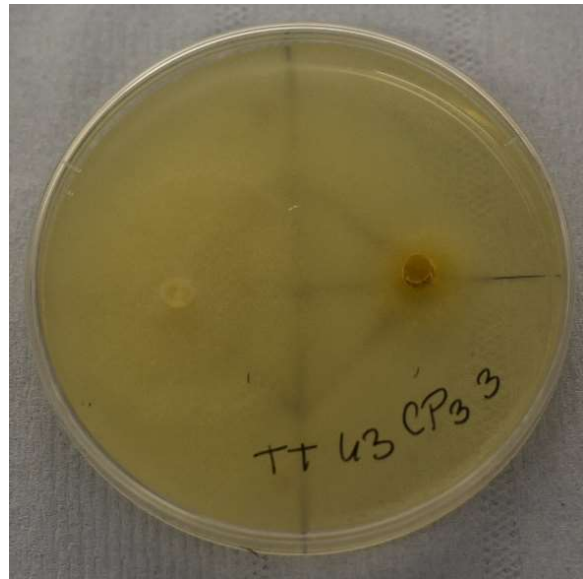
Slika 42. Izolat TT42 suprotstavljen sa izolatom CP1, drugo mjerenje, 27.1.2021.god.



Slika 43. Izolat TT42 suprotstavljen sa izolatom CP2, drugo mjerenje, 27.1.2021.god.



Slika 44. Izolat TT43 suprotstavljen sa izolatom CP1 drugo mjerenje, 27.1.2021.god.



Slika 45. Izolat TT43 suprotstavljen sa izolatom CP3, drugo mjerenje 27.1.2021.god.



Slika 46. Kontrolna Petrijeva zdjelica sa izolatom TT43, drugo mjerenje, 27.1.2021. god.