

Stručni članak  
*Professional paper*

Sanja Novak Agbaba<sup>1\*</sup>, Marija Gradečki-Poštenjak<sup>2</sup>, Nevenka Čelepirović<sup>3</sup>

## KVALITATIVNA SVOJSTVA I MIKOFLORA SVJEŽIH I SKLADIŠTENIH PLODOVA PITOMOG KESTENA (*Castanea sativa* Mill.)

### SAŽETAK

Plod pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.) se najčešće upotrebljava za proizvodnju šumskog reprodukcijskog materijala za pošumljavanje i obnovu šuma, te kao prehrambeni proizvod. Lako je kvarljiv i teško ga je uskladištiti bez značajnog gubitka vitaliteta. Cilj istraživanja je bio određivanje kvalitativnih svojstava i zdravstvenog stanja plodova pitomog kestena te detekcija vrsta gljiva i kukaca prije i tijekom skladištenja. Plodovi su sakupljeni u listopadu 2007. godine na području UŠP Požega. Analizirana su kvalitativna svojstva plodova prema standardnim ISTA metodama. Klijavost je iznosila 40 %, a vitalitet je iznosio 35 %. Uskladišten je u hladnjači HŠI na temperaturi 3 do 5 °C u PE vrećama. Nakon pet mjeseci skladištenja analizirano je zdravstveno stanje plodova. Analizom je utvrđeno visoko učešće zaraženih plodova u iznosu od 60 %. Gljive su determinirane klasičnom morfološkom analizom primjenom makro i mikro metoda i molekularnom metodom. Detektirano je osam vrsta patogenih gljiva i dvije vrste kukaca: *Alternaria alternata* (Fr.) Kisler, *Aspergillus flavus* Link., *Aspergillus niger* Tiegh, *Ciboria batschiana* (Zopf) Buchw., *Penicillium* spp., *Phomopsis castanea* (Sacc.) Höhn, *Trichoderma citrinoviride* Pers., *Trichothecium roseum* Link., i *Curculio elephas* Gill., *Cydia splendana* Hb.

**Ključne riječi:** pitomi kesten, patogene gljive, kukci, skladištenje, kvaliteta, molekularna detekcija

---

<sup>1</sup>Hrvatski šumarski institut, Zavod za zaštitu šuma i lovno gospodarenje, Cvjetno naselje 41, Jastrebarsko, Hrvatska

<sup>2</sup>Hrvatski šumarski institut, Zavod za uzgajanje šuma, Cvjetno naselje 41, Jastrebarsko, Hrvatska

<sup>3</sup>Hrvatski šumarski institut, Zavod za genetiku, oplemenjivanje šumskog drveća i sjemenarstvo, Cvjetno naselje 41, Jastrebarsko, Hrvatska

\* Kontakt autor: Sanja Novak Agbaba (sanjan@sumins.hr)

## UVOD

Pitomi kesten (*Castanea sativa* L.) je bjelogorična vrsta drveća iz porodice Fagaceae. Botaničari ga svrstavaju u voćkarice, no zbog mjesta rasta spada i u šumsko drveće. Primarno se koristi za proizvodnju građevnog materijala, za ogrijev, za hranu, a dobro je poznat i kao medonosna vrsta. Potječe iz područja Male Azije, udomaćen je u južnoj Europi i u zemljama oko Sredozemnog mora. Rimljani su širili pitomi kesten diljem Rimskog carstva sve do Velike Britanije (Conedera i sur. 2004).

U Hrvatskoj se rasprostire u brežuljkasto-brdskom području kontinentalnog dijela Hrvatske te u Istri i na otocima Krku i Cresu. Veći dio areala rasprostire se kroz središnju Hrvatsku, od slovenske granice do granice s Bosnom i Hercegovinom, a najveće i najljepše sastojine nalaze na Zrinskoj i Petrovoj gori te na Medvednici (Medak 2009, Idžojić i sur. 2010). Najveći kompleksi šuma nalaze na karlovačkom i sisačkom području, te oko grada Zagreba. Pitomi kesten u Hrvatskoj dolazi na površini od 136.000 ha (Novak Agbaba i sur. 2000), a ukupna drvna zaliha iznosi 0,8 %. Vrsta je koja zahtjeva dublje i umjereno svježje tlo, a izbjegava hladna i maglovita staništa. U kontinentalnom dijelu Hrvatske raste na nadmorskim visinama od 200 do 700 m na različitim ekspozicijama i tipovima tla (Poljak i sur. 2012). Raste na izrazito kiselim tlima (pH 4 do 5) i kalcifoban je (Franjić i Škvorc 2020). U pojasu kitnjakovih i bukovich šuma tvori čiste ili mješovite sastojine, gdje se mezofilne kestenove šume nalaze na sjevernim i istočnim ekspozicijama te na više ili manje strmim nagibima i zasjenjenim položajima, a acidofilne kestenove šume na suhim južnim i zapadnim padinama (Medak 2004, 2009, Medak i Perić 2007).

Pitomi kesten cvate kasnije od ostalih vrsta bjelogorice, u lipnju. Plod je sjajni, glatki, tamnosmeđi, kožnati, jednolično obojeni ili uzdužno tamnije prugasti, 2-3 cm veliki, većinom jednosjemeni oraščić (kesten). Plodovi se nalaze u zajedničkoj kupuli 1 do 3 komada. Kupule su loptaste, kožaste i gusto pokrivene igličastim savitljivim ljuskama. Plodovi dozrijevaju i otpadaju u listopadu. Dozrela kupula puca na 4 dijela. Plodovi su zoohorni (Idžojić, 2013). Krupnoća plodova je varijabilna pa broj plodova u 1 kg varira od 100 – 120 plodova (Idžojić, 2013), od 100 do 230 sjemenka, prosječno oko 160 plodova (Regent 1980), od 150 do 300 plodova (Gordon and Rowe 1982), od 159 do 258 plodova, prosječno 207 komada (baza podataka LIS HSI 2007. do 2015. godine). Prosječna klijavost plodova kreće se od 55 do 98,8 % (Herman 1971, WSL 1991, Regent 1980, Delard i sur. 2007, Benedetti i sur. 2012, Čiçek i Tilki 2007). Minimalna klijavost sjemena prema hrvatskom standardu (HRS) je 60 %. Istraživanja kvalitativnih svojstava šumskog sjemena u Hrvatskoj u početku su se bazirala na ispitivanju primjenjivosti različitih metoda određivanja kvalitativnih svojstava sjemena (Mučalo 1959, Mučalo i Regent, 1968a, 1968b, Regent 1966,

Borzan i sur. 1990a, 1990b), a kasnije na istraživanju kvalitativnih svojstava i načina skladištenja različitih gospodarski značajnih vrsta šumskog sjemena (Gradečki i sur. 1993, 1996, 2018). Za očuvanje visoke kvalitete plodova sakupljanje, manipulacija i način skladištenja plodova vrlo su značajni. Plodovi pitomog kestena su lako kvarljivi i treba ih sakupiti odmah nakon dozrijevanja, s tla ili s mreža. Sakupljanje treba započeti kada se kupule počnu otvarati kako bi se spriječilo isušivanje ploda. Prema načinu skladištenja plodovi kestena spadaju u skupinu 'recalcitrant' što znači da je sjeme vrlo osjetljivo na gubitak vlage i temperaturu skladištenja, te se zbog toga ne može skladištiti na duže razdoblje bez značajnog gubitka vitaliteta (Pritchard i Manger 1990). Plodovi su plitko dormantni što također negativno utječe na smanjenje kvalitete. Za očuvanje vitaliteta tijekom skladištenja potrebno je sačuvati visok sadržaj vlage u plodovima te ga čuvati na temperaturama od -3 do +5 °C (Gosling 2007, Bonner 2008). Regent (1980) preporuča čuvanje sjemena u jažicama, na otvorenom u hrpama koje se pokriju lišćem ili u podrumu u sanducima u vlažnom stratifikatu s pijeskom omjera 1:1 ili sa oko 35 % vlage na temperaturi od 0 do 5 °C.

Plod pitomog kestena bogat je hranjivim tvarima te je pogodan kao supstrat za rast gljivičnih organizama. Osim toga sadrži veću količinu vlage (40 – 48%) što također pogoduje razvoju i rastu gljiva. Mikrogljive koje dolaze na kestenovom plodu su vrste koje stvaraju mnoštvo spora. Prema načinu ishrane dijele se na saprofite, parazite, fakultativne parazite i saprofite, nekrotrofne parazite i specijalizirane parazite (Novak Agbaba 2006). Od nekrotrofnih parazita koji dolaze na kestenovom plodu su *Ciboria batschiana* i *Alternaria alternata*. Gljiva *C. batschiana* je ujedno i specijalizirani parazit koji napada zdravi plod. Saprofiti kao i paraziti mogu oštetiti sjeme i smanjiti njegov vitalitet. Saprofitske gljive *Penicillium* spp. (Marinelli i sur. 2008) u skladišnim uvjetima utječe na smanjenje klijavosti.

Gljive mogu zaraziti vanjsku ljusku, kotiledone i embrio (Čizmić 1987 i 1990). Na površini sjemena gljive poput *Alternaria* spp. i *Fusarium* spp. dolaze u obliku spora ili micelija. Gljiva miruje na sjemenu dok ne dođe u pogodne uvjete kada počinje rasti, razmnožavati se i širiti zarazu. Gljive koje uzrokuju unutarnju zarazu sjemena su *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Ciboria batschiana*, *Phomopsis quercella* i dr. (Washington i sur. 1997; Wells i Payne 1980). Morfologija gljiva se tradicionalno koristi za identifikaciju vrsta. Plodna tijela gljiva koje stvaraju spore nastale kao rezultat nespornog (mitoze) ili spolnog (mejoze) razmnožavanja i vegetativnog tijela (micelij) koriste se kao sredstvo za identifikaciju. Međutim, morfološki pristupi identifikaciji gljiva neće uvijek dati točne rezultate na razini vrste. U nekim vrlo specifičnim rodovima gljiva, morfološke karakteristike vrsta roda mogu biti sporne zbog njihove sličnosti. Za gljive

koje sporuliraju u kulturi oblik i veličina spora mogu pokazati vrlo različite karakteristike kod iste vrste što čini identifikaciju otežanom. Za spolna stanja (teleomorfe), askospore se ne proizvode često u kulturi, što otežava njihovu morfološku identifikaciju. Za brzu i pouzdanu identifikaciju vrsta gljiva koriste se DNA metode. Jedna od najkorisnijih sekvenci jezgrine DNA u identifikaciji vrste je ribosomalna ITS regija (eng. internal transcribed spacer; hrv. unutarnja transkripcijska razmaknica) u kojoj se nalaze dvije visoko varijabilne nekodirajuće regije (ITS1, ITS2). Određivanje vrste se temelji na uspoređivanju nepoznatog slijeda ITS sekvenci s podacima u međunarodnim bazama podataka sekvenci (GenBank u Nacionalnom centru za biotehnoške informacije, NCBI; Europska arhiva nukleotidnih sekvenci Europskog laboratorija za molekularnu biologiju, EMBL; Japanska DNA banka, DDBJ; Nordijska baza podataka ITS ektomikorize prilagođena korisniku, UNITE) (Schoch 2012, Blaaid 2013, Raja 2017).

Cilj istraživanja je određivanje kvalitativnih svojstava i zdravstvenog stanja plodova pitomog kestena te detekcija vrsta gljiva koje dolaze na plodu pitomog kestena prije i tijekom skladištenja.

## MATERIJAL I METODA RADA

### PORIJEKLO PLODOVA PITOMOG KESTENA

Plodovi pitomog kestena sakupljeni su u listopadu 2007. godine u sjemenskoj sastojini pitomog kestena, šumskom sjemenskom objektu tipa selekcioniran, na području Uprave šuma Podružnice Požega. S obzirom na rajonizaciju sastojina se nalazi u sjemenskoj zoni šuma hrasta kitnjaka, bukve i pitomog kestena u sjemenskoj regiji srednja Hrvatska. Podaci o sjemenskoj sastojini prikazani su u Tablici 1.

Prema Köppenovoj klasifikaciji sjemska sastojina se nalazi u zoni tople-umjereno kišne klime Cfwbx” i humidne klime sa indeksom efektivnosti oborina (P/E = od 64 do 127), gdje se temperatura najhladnijeg mjeseca kreće između -3 °C do + 18 °C, ljeta su svježija s mjesečnom temperaturom najtoplijeg mjeseca ispod 22 °C. Oborine su jednoliko razdijeljene na cijelu godinu, ali najsušni dio godine pada u hladno godišnje doba. Maksimumu količine oborina koji se pojavljuje u

početku toplog dijela godine pridružuje se maksimum u kasnoj jeseni. Sastojina se razvija na matičnom supstratu koji čine kisele silikatne stijene, gline, granit, pješčenjaci itd. na kojem se je razvilo distrično smeđe tipično ili ilimerizirano tlo.

### KVALITATIVNA SVOJSTVA PLODOVA PITOMOG KESTENA

Kvalitativna svojstva plodova pitomog kestena analizirana su u Laboratoriju za ispitivanje sjemena Hrvatskog šumarskog instituta u jesen 2007. godine. Ispitivanje kvalitete i uzorkovanje prosječnih i radnih uzoraka sjemena obavljeno je prema ISTA metodologiji (ISTA Rules 2007). Ispitana su slijedeća fizička i fiziološka svojstva kvalitete: čistoća sjemena (ČIST\_P), sadržaj vlage u sjemenu (SV\_P), masa 1000 sjemenaka (MTS\_G), klijavost (KLI\_P) i vitalitet sjemena (VIT\_P) te zdravstveno stanje. Navedena i analizirana kvalitativna svojstva predstavljaju osnovne varijable iz kojih su izvedene i nove varijable koristeći formule navedene u Tablici 2.

**Tablica 2.** Izvedene varijable za procjenu kvalitete plodova pitomog kestena

| Naziv varijable  | Formula   |
|--|---|
| Uporabna vrijednost sjemena (%) = (UVS_P)                            | $UVS\_P (\%) = \frac{\text{ČIST} \cdot \text{KLI}}{\text{VIT}} / 100$ |
| Broj čistog sjemena u 1 kg (kom) = (BČS_KG)                          | $BČS = 1000000 / \text{MTS\_G}$                                       |
| Broj klijavih ili vitalnih sjemenaka u 1 kilogramu (kom) = (BK_VSKG) | $BK\_VS\_P = BČS \cdot UV\_P / 100$                                   |

Parametri ispitivanja klijavosti plodova pitomog kestena daju osnovne informacije o dužini trajanja ispitivanja, podlozi, temperturi naklijavanja, prepariranju plodova i klasifikaciji normalnih klijanaca odnosno % klijavosti (Tablica 3).

### NAČIN SKLADIŠTENJA PLODOVA PITOMOG KESTENA

Kako bi se istražilo koje su vrste patogenih gljiva prisutne u plodovima (primarna infekcija), a koje se razvijaju

**Tablica 1.** Podaci o sjemenskoj sastojini pitomog kestena

| Gospodarska jedinica | Površina (ha) | Zemljopisna širina | Zemljopisna dužina | Nadmorska visina | Tip tla                    | Biljna zajednica                           | Ekološko gospodarski tip | Starost (g) |
|----------------------|---------------|--------------------|--------------------|------------------|----------------------------|--|--------------------------|-------------|
| Istočni Pšunj 32 a   | 22.87         | 45° 15'            | 18° 02'            | 250-340          | distrično smeđe-kiselo tlo | <i>Quercus-Castanetum illyricum</i> Horvat | II-E-11                  | 97          |

**Tablica 3.** Parametri ispitivanja klijavosti plodova pitomog kestena, Izvor: Table 5A Part 2, Tree and Shrub seeds, (ISTA - International Rules for Seed Testing – važeća verzija, Annexe to Chapter 5: The Germination Test)

| Vrsta drveća<br>(latinski i hrvatski<br>naziv) | Ispitivanje klijavosti sjemena |                |                               |                                  |  | Tip<br>klijanaca | Grupa<br>klijanaca |
|--|--------------------------------|----------------|-------------------------------|----------------------------------|--|------------------|--------------------|
|  | Podloga                        | Temperatura °C | Prvo brojanje<br>(nakon dana) | Završno brojanje<br>(nakon dana) | Dodatne upute<br>i preporuke<br>za svladavanje<br>dormantnosti                                 |                  |                    |
| 1  | 2                              | 3              | 4                             | 5                                | 6  | 7                | 8                  |
| Castanea sativa                                | NP; (P)                        | 20 - 30        | 7                             | 21                               | Močiti sjeme 48 sati,<br>odrezati na kraju ožiljka<br>i ukloniti unutrašnju<br>sjemenu ljusku. | G                | B-2-2-2-2          |

tijekom skladištenja (sekundarna infekcija) nakon analize kvalitativnih svojstava plodovi su uskladišteni u zatvorenim PE vrećicama i smješteni u hladnjak na temperaturu +3 do + 5 °C u trajanju od 5 mjeseci.

#### ZDRAVSTVENA ANALIZA PLODOVA PITOMOG KESTENA

Nakon skladištenja analizirano je zdravstveno stanje sjemena. Analiza je obavljena u Laboratoriju za fitopatološka ispitivanja Hrvatskog šumarskog instituta. Veličina uzorka je bila 200 plodova. U uzorku je utvrđen broj zdravih i zaraženih plodova. Plodovi su dezinficirani 70 % etilnim alkoholom i isprani dva puta u sterilnoj destiliranoj vodi. Plodovi su stavljani u plastične posude s poklopcem na sterilnu staničevinu te inkubirani u klimakomori na temperaturi od 25 °C. Razvoj vegetativnih i plodnih tijela gljiva na plodovima praćen je tri tjedna. Vrste gljiva određene su klasičnom fitopatološkom metodom (makroskopskom i mikroskopskom morfološkom analizom). Odabrani uzorci gljivičnih organizama odvojeni su za molekularnu detekciju.

#### MOLEKULARNA DETEKCIJA VRSTA GLJIVA

Molekularna detekcija vrste gljiva napravljena je u Laboratoriju za molekularno-genetička ispitivanja Hrvatskog šumarskog instituta uz korištenje usluge sekvenciranja DNA laboratorija Zavoda za sudsku medicinu i kriminalistiku Medicinskog fakulteta u Zagrebu. DNA je ekstrahirana iz 0,1 g inficiranog ploda prema CTAB metodi (Doyle i Doyle 1987) korištenjem 2 % cetil trimetil amonijev bromid (CTAB) pufera s dodatkom 1 % (m/v) polivinilpirolidona (PVP). DNA je otopljena u 50 µl ultračiste vode. Kvaliteta i količina izolirane DNA provjerena je elektroforezom u 1x TBE puferu, pH 8,0 korištenjem 0,8 % agaroznog gela

obojenog bojom GelStar Nucleic Acid Gel Stain (Lonza Rockland, Inc., Rockland, SAD). Lambda DNA/Hind III fragment (Invitrogen, Njemačka) korišten je kao DNA marker. ITS2 sekvenca dobivena je amplifikacijom korištenjem univerzalnih parova početnica ITS3-ITS4 (White i sur. 1990). PCR amplifikacija je izvedena u volumenu od 20 µl koji sadrži 1x PCR pufera, 0,8 mg/ml BSA (goveđi serum albumin, Amersham Pharmacia Biotech, SAD), 0,5 µM svake početnice, 1 jedinicu TaKaRa Taq DNA polimeraze (Takara, Japan) i 0,6 ng izolirane DNA. Parametri ciklusa amplifikacije bili su sljedeći: početna denaturacija od 5 min, 94 °C i 30 ciklusa od 1 min 95 °C, 1 min do 56 °C i 1 min 72 °C i završni ciklus od 10 min, 72 °C. PCR reakcije provedene su zajedno s negativnom kontrolom koja je sadržavala ultračistu vodu umjesto DNA. Amplifikacija fragmenata DNA provedena je u PTC uređaju 100 (MJ Research, SAD). Svi PCR fragmenti razdvojeni su elektroforezom na 1,8% agaroznom gelu u 1x TBE puferu pH 8,0 obojenom GelStar bojom nukleinske kiseline (Lonza Rockland, Inc., Rockland, SAD). Kao marker molekularne težine korišten je DNA marker TrackIt 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Njemačka), a gel je fotografiran pod UV svjetlom (UVtec Cambridge, UK). Pripremljena DNA je pročišćena iz 1,8 % agaroznog gela korištenjem PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, Njemačka). Za sekvenciranje u oba smjera korištene su iste početnice kao i za amplifikaciju (ITS3/ITS4). Sekvenciranje amplificiranih PCR fragmenata izvedeno je korištenjem kompleta BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), a razdvajanje fragmenata kapilarnom elektroforezom na instrumentu ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Vrste gljiva su određene pretraživanjem genske banke (GenBank, NCBI, Bethesda, MD, SAD) pomoću programa BLAST (Basic

Local Alignment Search Tool, NCBI). ITS2 sekvence su pohranjene u gensku banku (GenBank, NCBI, Bethesda, MD, SAD) pod pristupnim brojevima.

## REZULTATI I RASPRAVA

### KVALITATIVNA SVOJSTVA PLODOVA PITOMOG KESTENA

Rezultati ispitivanja kvalitativnih svojstva svježe sakupljenih plodova pitomog kestena prikazani su u Tablici 4.

i vitalitet, a time indirektno i uporabna vrijednost sjemena. Osim toga značajan je i prilikom određivanja načina i dužine trajanja skladištenja. Za očuvanje visoke kvalitete plodova vrlo su značajni postupci tijekom sakupljanja i manipulacije te način skladištenja plodova. Prema načinu skladištenja plodovi pitomog kestena spadaju u skupinu –‘recalcitrant’ što znači da je takvo sjeme/plodove teško uskladištiti na dulje vrijeme. U tu skupinu spada sjeme malog broja vrsta šumskog drveća umjerenog pojasa (*Acer pseudoplatanus* L., *Aesculus hippocastanum* L., *Castanea* spp., *Quercus* spp., *Populus* spp. i *Salix* spp.). Sjeme iz skupine ‘recalcitrant’ vrlo je

Tablica 4. Kvalitativna svojstva svježe sakupljenih plodova pitomog kestena

| Kvalitativna svojstva plodova |                             |                                   |                         |    |               |    |  |                                 |
|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|-------------------------|----|---------------|----|--|---------------------------------|
| (%)                           | Sadržaj vlage (%)<br>(SV_P) | Masa 1000 sjemenaka (g)<br>(TS_G) | Klijavost (%)<br>(LI_P) |    | Vitalitet (%) |    | Broj klijavih vitalnih sjemenaka /1kg (kom)<br>(BK_VSKG) | Uporabna vrijednost sjemena (%) |
| 100,00                        | 45,5                        | 4.678                             | EKL                     | 40 | VS            | 35 | 86   | 40                              |
|                               |                             |                                   | NOK                     | 40 | NS-O          | 5  |  |                                 |
|                               |                             |                                   | NEK                     | 0  | NS-           | 60 |  |                                 |
|                               |                             |                                   | SNS                     | 0  | MS            |    |  |                                 |
|                               |                             |                                   | MS                      | 60 | NS-Š          | 0  |  |                                 |

**Kategorije klijavog sjemena:** EKL-energija klijavosti sjemena, NOK-klijavost sjemena (normalni klijanci), NEK – Nenormalni klijanci, SNS-svježe neisklijalo sjeme, MS-mrtno sjeme; **Kategorije vitalnog sjemena:** VS-vitalno sjeme, NS-O - nevitalno sjeme-ostalo, NS-MS - nevitalno sjeme zaraženo patogenim gljivama i insektima (mrtvo sjeme), NS-Š-nevitalno sjeme - šturo (sjeme bez embrija i endosperma).

### ČISTOĆA PLODOVA PITOMOG KESTENA

Čistoća je izraz koji označava koliko je neka partija sjemena, za koju se ispituje kvaliteta, ‘čista’. Čistoća partije sjemena pokazuje u postocima veličinu frakcije ‘čistog sjemena’ dotične vrste, veličinu frakcije ‘druge vrste sjemena’ te veličinu frakcije ‘inertne materije’. Čistoća sjemena iznosila je 100,00 %, što znači da u uzorku nije bilo prisutnih drugih vrsta šumskog sjemena niti prisutnosti inertnih materija koje bi negativno utjecale na uporabnu vrijednost sjemena odnosno na broj plodova u 1 kg klijavog ili vitalnog sjemena.

### SADRŽAJ VLAGE U PLODOVIMA PITOMOG KESTENA

Sadržaj vlage svježih plodova iznosio je 45,5 % i za ovaj tip sjemena bio je zadovoljavajući. Sadržaj vlage značajno je svojstvo kvalitete sjemena o kojem ovise i klijavost

osjetljivo na gubitak vlage u sjemenu i na temperaturu skladištenja bez značajnog gubitka vitaliteta, te se ne može uskladištiti dulje od 6 mjeseci. Uz vrlo dobru njegu trajanje skladištenja može trajati i do 18 mjeseci, a u nekim slučajevima i do 3,5 godine (Jayens 1975, Bonner 2008, Gosling 2007). Kod sjemena/plodova iz ove skupine moguće je sniziti sadržaj vlage u sjemenu samo do određene granice, koja ovisi o vrsti, a kreće se od 40 do 48 %. Prema Sanderu (1974) sadržaj vlage u plodovima pitomog kestena mora biti od 40 do 45 %. Snižavanje sadržaja vlage ispod te granice značajno smanjuje njihov vitalitet. Vrste krupnih plodova bjelogorice u koju spadaju rodovi *Quercus*, *Castanea*, *Aesculus* i *Fagus* su vrste koje u dozrelom sjemenu imaju visok sadržaj vlage, 40 – 50 %. Kada sadržaj vlage padne ispod određene granice nužno je računati s gubitkom njihove klijavosti i vitaliteta npr. kod kitnjaka 25 %, kod lužnjaka 22 % ili kod crvenog hrasta 20 % (Messer 1960).

## KLIJAVOST I VITALITET PLODOVA PITOMOG KESTENA

Klijavost svježih plodova kestena bila je niska i iznosila je 40 %. Analizom kategorija klijavog i neklijavog sjemena ustanovljeno je da je prisutnost patogenih gljiva iznosila 60 %, te da nije bilo drugih kategorija neklijavog sjemena. Na svježim plodovima kestena bila je utvrđena prisutnost gljiva *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* i *Ciboria batchiana*. Zaraza ovim gljivama vjerojatno je nastala u sastojini u vrijeme sakupljanja plodova. Razvoju patogenih gljiva na plodovima pogodovale su i temperatura naklijavanja (od 20 do 30 °C) i visok sadržaj vlage u plodovima (Tablica 3., ISTA Rules). Trajanje klijavosti je 21 dan, a energija klijavosti je utvrđena nakon 7 dana. Energija klijavosti iznosila je 40 %. Nakon tog vremena do kraja procesa naklijavanja patogene gljive potpuno su unštile plodove kestena. Gotovo isti rezultat dobili smo i analizom vitaliteta koristeći brzu biokemijsku tetrazol metodu. Vitalitet sjemena iznosio je 35 %, a učešće nevitnog - mrtvog sjemena 60 %. Drvodelić i sur. (2019) navode podatke o postotku klijavosti plodova pitomog kestena u iznosu od 35,5 %. Kako bi dobili uvid u kvalitetu plodova koji su sakupljeni u prirodnim sastojinama na području areala rasprostranjenosti pitomog kestena u Hrvatskoj analizirani su podaci o kvalitativnim svojstvima plodova u razdoblju od 2007. do 2015. godine (Baza podataka Laboratorija za ispitivanje sjemena HŠI, Tablica 5.).

Klijavost plodova pitomog kestena prosječno je iznosila 34 %, a kretala se u rasponu od 9 do 67 %. U Hrvatskom standardu minimalna propisana klijavost plodova

iznosi 60% te se može zaključiti da je klijavost niža od minimalne. Analizom pojedinih kategorija sjemena tijekom naklijavanja ustanovljeno da je učešće plodova zaraženih patogenih gljivama prosječno iznosilo 59 %, dormantnih plodova 3 % i nenormalnih klijanaca 4 %. Plodovi pitomog kestena su lako kvarljivi i mogu izgubiti vitalitet u roku od tjedan dana stoga ih treba sakupiti odmah nakon dozrijevanja, s tla ili s mreža (USDA 1951). Sakupljanje treba započeti kada se kupule počnu otvarati. Plodovi ne podnose isušivanje pa je potrebno učestalo sakupljanje osobito ako je vrijeme toplo i suho. Osim što pripadaju skupini sjemena 'recalcitrant' plodovi pitomog kestena pokazuju i plitku dormantnost (shallow dormant species). Interakcija između tih dviju osobina dodatno komplicira očuvanje njihove kvalitete. Vrste sjemena iz skupine 'recalcitrant' su najmanje dormantne i najlakše ih je naklijati, ali su sve vrlo zahtjevne za rukovanje jer ne podnose isušivanje i jednostavno ih je vrlo teško uskladištiti. Općenito je pravilo da će 10-50 % plodova hrasta i kestena propasti između jesenskog sakupljanja i proljetne sjetve (Gosling 2007, Bonner 2008). Iz navedenog proizlazi činjenica da na kvalitetu plodova osim genetičkih, fizičkih i fizioloških osobina značajno utječu prisutnost zaraženih plodova te manipulacija tijekom sakupljanja, dorade i privremenog skladištenja.

U odnosu na rezultate drugih istraživanja klijavost plodova pitomog kestena u Hrvatskoj je niska. Çiçek i Tilki (2007) navode da se u istraživanim prirodnim populacijama pitomog kestena klijavost plodova kreće od 91,3 do 98,8 %. Razlog tome je dorada plodova odmah nakon sakupljanja. Plodovi se ispiru tekućom

**Tablica 5.** Kvalitativna svojstva plodova pitomog kestena u razdoblju od 2007. do 2015. godine.

| Red. broj | Godina sakupljanja | Kvalitativna svojstva sjemena |              |         |           |           |                |                   |
|-----------|--------------------|-------------------------------|--------------|---------|-----------|-----------|----------------|-------------------|
|           |                    | ČIST (%)                      | SV (%)       | MTS (g) | KLI (%)   | UVS (%)   | BČS/1 kg (kom) | BK_VS u 1kg (kom) |
| 1.        | 2007.              | 100,00                        | 46,5         | 4.678   | 40        | 40        | 214            | 86                |
| 2.        | 2008.              | 100,00                        | 46,7         | 3.913   | 20        | 20        | 255            | 51                |
| 3.        | 2009.              | 100,00                        | 38,5         | 3.883   | 32        | 32        | 258            | 82                |
| 4.        | 2010.              | 100,00                        | 48,8         | 6.288   | 9         | 9         | 159            | 14                |
| 5.        | 2012.              | 100,00                        | 51,2         | 5.710   | 67        | 67        | 175            | 117               |
| 6.        | 2014.              | 100,00                        | 55,1         | 4.810   | 28        | 28        | 208            | 58                |
| 7.        | 2015.              | 100,00                        | 58,1         | 6.140   | 43        | 43        | 163            | 70                |
| 8.        | 2015.              | 100,00                        | 41,0         | 4.405   | 30        | 30        | 227            | 68                |
|           | <b>prosječno</b>   | <b>100,00</b>                 | <b>4.979</b> |         | <b>34</b> | <b>34</b> | <b>207</b>     | <b>68</b>         |

ČIST - čistoća sjemena; SV - sadržaj vlage u sjemena; MTS - masa 100 sjemenaka; KLI - klijavost sjemena; UVS - uporabna vrijednost sjemena; BČS/1 kg = broj čistih sjemenaka u 1 kg; BK/VS u 1 kg = Broj klijavih ili vitalnih sjemenaka u 1 kg

vodom, a metodom flotacije dodatno se odstranjuju sve nečistoće i okularno loši plodovi zaraženi insektima i gljivama. Benedetti i sur. (2012) također navode visoku klijavost plodova (85,4 %). Za utvrđivanje klijavosti plodova u istraživanju nisu koristili ISTA metodu nego su plodove naklijavali u stakleniku u određenim uvjetima, u kontejnerima, u trajanju od 91 dan, a tijekom naklijavanja plodovi su bili tretirani fungicidima. Iz iznesenog se može zaključiti da su visoki rezultati klijavosti plodova posljedica manipulacije i dorade prije ispitivanja klijavosti, korištenje druge metode naklijavanja te tretiranje zasijanih plodova fungicidima.

### BROJ PLODOVA U 1 KG I BROJ KLIJAVIH PLODOVA PITOMOG KESTENA U 1KG

Broj plodova u 1 kg i broj klijavih plodova u 1 kg značajan su pokazatelj prilikom planiranja rasadničke proizvodnje šumskog reprodukcijskog materijala za dopunu prirodne obnove bilo sadnicama bilo sjemenom. Broj plodova u 1 kilogramu iznosio je 214 komada. Kada se uzme u obzir i varijable klijavosti ili vitaliteta sjemena broj plodova se smanjuje, što je vidljivo iz broja klijavih plodova u 1 kilogramu. Važno je naglasiti da je kod sjemena niske klijavosti broj plodova reduciran ovisno o postotku klijavosti. Broj klijavih plodova također je bio nizak i iznosio je 86 komada, a to je značajno manje nego što je iznosio broj plodova u 1 kilogramu.

### ZDRAVSTVENO STANJE I VRSTE PATOGENIH GLJIVA NA PLODOVIMA PITOMOG KESTENA NAKON SKLADIŠTENJA

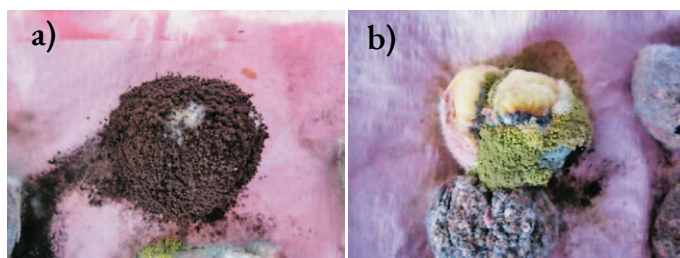
Analizom mikoflore utvrđena je zaraza gljivama od 60 %. Na 12 % plodova osim gljiva bila je prisutna larva *Curculio elephas* Gill., dok je na 9 % plodova zaraženih gljivom bila prisutna larva insekta *Cydia splendana* Hb. Utvrđeno je osam vrsta gljiva: *Alternaria alternata* (Fr.) Kisler, *Aspergillus niger* Tiegh., *Aspergillus flavus* Tiegh., *Ciboria batschiana* (Zopf) Buchw., *Penicillium* spp., *Phomopsis* spp., *Trichothecium roseum* Link., *Trichoderma citrinoviride* Bissett. Prema morfološkim karakteristikama četiri vrste gljiva nisu bile jasno detektirane te su one analizirane molekularnom metodom. Dužine sekvenci ITS2 regije analiziranih gljiva iznosile su od 310 do 352 parova baza. Prijavljene su u međunarodnu gensku banku GenBank (NCBI) te je svakoj pojedinačno dodijeljen pristupni broj (Tablica 6.).

**Tablica 6.** Postotak vrsta gljiva na zaraženim plodovima pitomog kestena i njihov pristupni broj u genskoj banci

| Vrsta gljive                     | Postotak vrsta gljiva na zaraženim plodovima | Pristupni broj u genskoj banci (GenBank, NCBI) |
|----------------------------------|--|--|
| <i>Alternaria alternata</i>      | 4  | -  |
| <i>Aspergillus flavus</i>        | 15   | KY496596                                       |
| <i>Aspergillus niger</i>         | 7.7  | KY496593                                       |
| <i>Ciboria batschiana</i>        | 19   | -  |
| <i>Penicillium</i> spp.          | 10   | -  |
| <i>Phomopsis castanea</i>        | 42   | -  |
| <i>Trichoderma citrinoviride</i> | 7.7  | KY496594                                       |
| <i>Trichothecium roseum</i>      | 7.6  | KY496595                                       |



Slika 1. Gljive na plodovima pitomog kestena nakon 3 tjedna inkubacije



Slika 2. Kolonija gljiva na plodu kestena. (a) *Aspergillus niger* (b) *Aspergillus flavus*

*C. batschiana* uzrokuje crnu trulež ploda i jedna je od značajnijih bolesti ploda pitomog kestena. Gljiva može inficirati plod askosporama nakon pada na tlo i u vrijeme kad se plod još nalazi na stablu putem inficiranog tkiva u kojem je prisutna kao endofit („seed-borne“) (Vettraino i sur. 2005). Tijekom skladištenja gljiva se aktivira i prorasta tkivo ploda. Vrlo brzo raste i sa zaraženog ploda infekcija se širi na okolne zdrave plodove (Tian i Bertolini 1997). Kukci *Curculio elephas* i *Cydia* spp. koji su nađeni u zaraženim plodovima mogu biti vektor prenošenja zaraze gljivama (Vettraino i sur. 2005a, b). Zaraza gljivama *P. castanea* i *A. alternata* nastala je u vrijeme razvoja ploda („seed-borne“) i u skladišnim uvjetima se nastavlja razvijati te prorasta i razara tkivo kotiledona. Gljiva *P. castanea* utvrđena je u najvećem postotku (42 %). Endofitski se pojavljuje u biljnim djelovima (cvjetovi, listovi, izbojci i plodovi) (Washington i sur. 1999). Gljive *Penicillium* spp., *T. roseum* i *T. citrinoviride* su saprofiti i slabi paraziti koji smanjuju klijavost i uništavaju tkivo plodova. *A. niger* i *A. flavus* su saprofiti i gljive skladišta te utječu na smanjenje klijavosti.

## ZAKLJUČAK

Analizom kvalitativnih svojstava svježe sakupljenih plodova pitomog kestena iz uroda 2007. godine ustanovljeno je da su vrijednosti vitaliteta i klijavosti niže od standardom propisanih minimalnih vrijednosti za klijavosti. Sadržaj vlage u plodovima bio je zadovoljavajući, te nije negativno utjecao na visinu klijavosti odnosno vitaliteta sjemena. Učešće mrtvog sjemena (zaraženi patogenim gljivama i insektima) bilo je visoko (60 %). Iz navedenog proizlazi činjenica da na kvalitetu plodova značajno utječu prisutnost zaraze te manipulacija tijekom sakupljanja i dorade, te skladištenja. Vrste gljiva utvrđene na plodovima su „seed-borne“ parazitske gljive *C. batschiana*, *P. castanea*, *A. alternata* i saprofitske gljive *T. roseum*, *Penicillium* spp., *T. citrinoviride*, *A. niger* i *A. flavus*. U uvjetima skladištenja ove gljive su slabi ili jaki patogeni koji uzrokuju nekrozu klice i tkiva kotiledona ploda, uzrokuju trulež, reduciraju klijavost i kvalitetu plodova. Neophodno je provoditi kvalitativnu i zdravstvenu analizu plodova kako bi se na temelju tih podataka odredile mjere zaštite prilikom skladištenja kao i prije uporabe za proizvodnju šumskog reprodukcijaskog materijalasa. Utvrđivanje vrsta gljiva i kukaca uzročnika oštećenja plodova pitomog kestena kombinacijom morfoloških i molekularnih metoda daje brzi i točan uvid u zdravstveno stanje plodova.

## SUKOB INTERESA

Autori nemaju sukob interesa za prijaviti.

## LITERATURA

- Conedera M, Manetti MC, Giudici F, & Amorini E, 2004. Distribution and economic potential of the Sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Europe. *Ecologia mediterranea*, 30(2): 179-193. <https://doi.org/10.3406/ecmed.2004.1458>
- Baza podataka LIS HŠI: baza podataka Laboratorija za ispitivanje sjemena Hrvatskog šumarskog instituta za razdoblje od 2007. do 2015. godine
- Blaalid R, Kumar S, Nilsson RH, Abarenkov K, Kirk PM, & Kauserud H, 2013. ITS 1 versus ITS 2 as DNA metabarcodes for fungi. *Molecular ecology resources*, 13(2): 218-224. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12065>
- Benedetti, S., M. González, E. García, I. Quiroz, 2012: An analysis of the physical and germination parameters of the sweet chestnut (*Castanea sativa*), *Cien. Inv. Agr.*, 39 (1): 185-192.
- Bonner, F.T., 2008: Chapter 4: Storage of Seeds, The Woody Plant Seed Manual, Department of Agriculture, Forest Service, 85-96, Washington.
- Borzan, Ž. Gradečki, M. Poštenjak, K., 1990a: Evaluation of English oak acorn viability by x-ray method. (Procjena klijavosti lužnjakova žira rendgenografskom metodom). Voluntary paper, Proceedings of Division 2: 487-487, IUFRO XIX World Congress, Montreal.
- Borzan, Ž. Gradečki, M. Poštenjak, K., 1990b: Procjena klijavosti lužnjakova žira rendgenografskom metodom. *Rad. Šumar. inst.* 25(2): 239-260.
- Čiçek, E., F. Tilki, 2007. Seed size effects on germination, survival and seedling growth of *Castanea sativa* Mill., *J. Biol. Sci.*, 7 (2): 438-441
- Čizmić, I., 1987. Bolesti povrća koje se prenose sjemenom i njihovo suzbijanje. U Maceljki M. i sur. *Zaštita povrća*, Znanje, Zagreb, 66-72.
- Delard, C., M. González, O. Ortiz, M.P. Molina, and C. Lopez. 2007. Producción de plantas forestales. In: Benedetti i sur.(eds.). *Castaña maderada de alto valor para Chile*. INFOR. Santiago, Chile. p. 157-187.
- Doyle J, & Doyle JL, 1987. Genomic plant DNA preparation from fresh tissue-CTAB method. *Phytochem Bull*, 19(11): 11-15.
- Drvodelić D, Poljak I, Perković I, Šango M, Tumpa K, Zegnal I, Idžojić M, 2019. Ispitivanje laboratorijske klijavosti pitomoga kestena (*Castanea sativa* Mill.) u skladu s pravilima ISTA. *Šumarski list*, 143 (9-10), 469-477. <https://doi.org/10.31298/sl.143.9-10.8>.
- Franjić J, Škvorc Ž, 2020. Šumsko drveće i grmlje Hrvatske (novo izdanje). Sveučilište u Zagrebu - Šumarski fakultet, Zagreb, 516 str.



- Gordon G, and Rowe F, 1982. Seed manual for ornamentals and shrubs. London, Forestry Commission. Bulletin 059: 132 pp.
- Gosling P, 2007. Raising trees and shrubs from seed: practice guide, Forestry Commission, 28 str, Edinburgh.
- Gradečki M, Poštenjak K, Topolovec V, 1993. Analiza nekih kvalitativnih osobina sjemena hrasta lužnjaka I sjemenskih sastojina u Hrvatskoj. Radovi 28, Broj 1-2: 37-54.
- Gradečki M, Poštenjak K, Topolovec V, 1996. Istaživanje laboratorijske i rasadničke klijavosti sjemena hrasta lužnjaka iz sjemenskih sastojina te njihovog visinskog rasta // Unapređenje Proizvodnje Biomase Šumskih Ekosustava. Knjiga 1 / Mayer, Branimir (ur.). Zagreb: Hrvatsko šumarsko društvo, 1996. str. 271-282.
- Gradečki-Poštenjak M, Novak Agbaba S, Čelepirović N, Posarić D, 2018. Qualitative properties of pedunculate oak acorns (*Quercus robur* L.) from Spačva basin and the consequences of its inadequate storage. Radovi 46(1): 1-13.
- Herman, J. 1971. Šumarska dendrologija. Priručnik za šumarske, drvno-industrijske i hortikulturne stručnjake, STANBIRO, p.p. 470.
- Idžojić M, 2013. Dendrologija cvijet, češer, plod, sjeme, Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, Zagreb, 118 str.
- Idžojić M, Medak J, Poljak I, Zebec M, Tutić B, 2010. Slijedeći tragove pitomog kestena (*Castanea* spp.) – Uzgoj i kultura, folklor i povijest, tradicija i korištenje, Šum. list, 134 (5-6): 294-300.
- ISTA, 2007: International Rules for Seed Testing, International Seed Testing Association (ISTA), Bassersdorf, Switzerland.
- Jaynes RA. 1975. Chestnuts. In: Janik J, Moore JN, eds. Advances in fruit breeding. West Lafayette, IN: Purdue University Press: 490-503.
- Marinelli, C., Migliorini, M., Funghini, L., Turchetti, T., Zanoni, B., & Canuti, S. (2008, September). Marrone del Mugello PGI: The "Water Curing" Process. In IV International Chestnut Symposium 844 (pp. 47-52).
- Medak J, 2004. Fitocenološke značajke šuma pitomog kestena u sjeverozapadnoj Hrvatskoj, Magistarski rad, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- Medak J, 2009. Šumske zajednice i staništa pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.) u Hrvatskoj, Disertacija, Šumarski fakultet Zagreb.
- Medak J, Perić S, 2007. Šume pitomog kestena u Hrvatskoj-fitocenološke, ekološke i gospodarske karakteristike, Zbornik sažetaka s 2. Hrvatskog botaničkog kongresa, 89.
- Messer H, 1960. Die Aufbewahrung und Pflege von Eicheln und Bucheln. J. D. Sauerlanders Verlag, Frankfurt am Main. Pp 44.
- Mučalo V, 1959: Ubrzanje klijanja i povećanje energije klijavosti sjemena pucaline (*Colutea arborescens* L.). Obavijesti 7, 1-6, Zagreb.
- Mučalo V, Regent B, 1968a. Ispitivanja o mogućnostima i ispravnosti upotrebe biokemijskih metoda (tetrazol, indigokarmin) za određivanje vitaliteta sjemena obične jele (*Abies alba* Mill.) i himalajskog cedra (*Cedrus deodara* Laws.), Zagreb, Izdanje Poslovnog udruženja šumsko privrednih organizacija. 1-29, Zagreb.
- Mučalo V, Regent B, 1968b. Određivanje vitaliteta sjemena nekih vrsta četinjača topografskim metodama (alpski, brucijski i crni bor, američki borovac, obična smreka). Izdanje Poslovnog udruženja šumsko privrednih organizacija. 1-23, Zagreb.
- 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 Šumarskog instituta 35 (1): 91-110.
- Novak Agbaba S, 2006. Mikoflora žira hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.) u Hrvatskoj, disertacija, Šumarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
- Poljak I, Idžojić M, Zebec M, Perković N, 2012. Varijabilnost europskog pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.) na području sjeverozapadne Hrvatske prema morfološkim obilježjima plodova, Šumarski list, 136 (9-10), 479-489. <https://hrcak.srce.hr/91430>
- Pritchard HW, Manger KR. 1990. Quantal response of fruit and seed germination rate in *Quercus robur* L. and *Castanea sativa* Mill. to constant temperatures and photon dose. Journal of Experimental Botany 41:1549-1557.
- Raja HA, Miller AN, Pearce CJ, Oberlies NH, 2017. Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. Journal of natural products, 80(3): 756-770. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>
- Regent, B., 1966: Nova, brza metoda određivanja klijavosti hrastova žira u klijalici na podlozi, od filter-papira. Izdanje Poslovnog udruženja šumsko privrednih organizacija, p.p. 16.

Regent B, 1980. Šumsko sjemenarstvo. Beograd: Jugoslavenski poljoprivredno-šumarski centar – Služba šumske proizvodnje, drugo dopunjeno izdanje.

Sander IL. 1974. *Castanea*, chestnut. In: Schopmeyer CS, tech. coord. Seeds of woody plants in the United States. Agric. Handbk. 450. Washington, DC: USDA Forest Service: 273–275.

Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, & Fungal Barcoding Consortium. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16): 6241-6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>.

Tian SP, & Bertolini P, 1997. Biology and pathogenicity of *Rachodiella castaneae* in chestnuts stored at low temperatures. *Journal of Plant Disease and Protection* 104: 23–28. <https://www.jstor.org/stable/43386937>.

USDA [United States Department of Agriculture]. 1951. Harvesting, treating, storing, and marketing chestnuts. Beltsville, MD: USDA Bureau of Plant Industry, Soils, and Agricultural Engineering. 4 p.

Vettraino AM, Speranza S, Paparatti B, Pucci C, and Vannini A, 2005a Association of the Black Rot Fungus *Ciboria batschiana* with the Chestnut Weevil *Curculio propinquus* in Chestnut Orchards in Central Italy. *Proc. IIIrd Intl. Chestnut Congress* Eds.: C.G. Abreu, E. Rosa & A.A. Monteiro *Acta Hort.* 693, ISHS 2005.

Vettraino AM, Paolacci A, and Vannini A, 2005b. Endophytism of *Sclerotinia pseudotuberosa*: PCR assay for specific detection in chestnut tissues. *Mycol. Res.* 109 (1): 96–102.

Washington WS, Allen AD, Dooley LB, 1997. Preliminary studies on *Phomopsis castanea* and other organisms associated with healthy and rotted chestnut fruit in storage. *Australas. Plant Pathol.* 26:37–43. <https://doi.org/10.1071/BT97023>

Washington WS, Hood V, Stewart-Wade S, 1999. *Phomopsis castanea*, a seed-borne endophyte in chestnut trees. Australian Vrste gljiva su određene pretraživanjem genske banke (GenBank, NCBI, Bethesda, MD, SAD) pomoću programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, NCBI). ITS2 sekvence su pohranjene u gensku banku (GenBank, NCBI, Bethesda, MD, SAD) pod pristupnim brojevima.

## QUALITATIVE PROPERTIES AND MYCOFLORA OF FRESH AND STORED FRUITS OF SWEET CHESTNUT (*Castanea sativa* Mill.)

### SUMMARY

The fruit of the sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) is most often used for the production of forest reproductive material for afforestation and reforestation, and as a food product. It is easily perishable and difficult to store without significant loss of viability. The aim of the study was to determine the qualitative properties and health status of sweet chestnut fruits and the detection of fungal and insect species before and during storage. The fruits were collected in the Forest Administration Požega in October 2007. The qualitative properties of the fruits according to ISTA Rules were analyzed. The germination was 40% and viability was 35%. The fruits were stored in PE bags in the refrigerator at a temperature of 3 to 5° C. After five months of storage, the health status of the fruits was analyzed. The analysis revealed a high percentage of infected fruits (60%). The fungi were determined by classical morphological analysis using macro and micro methods and molecular method. Eight species of pathogenic fungi and two species of insects were detected: *Alternaria alternata* (Fr.) Kisler, *Aspergillus flavus* Link., *Aspergillus niger* Tiegh, *Ciboria batschiana* (Zopf) Buchw., *Penicillium* spp., *Phomopsis castanea* (*Saccichodide*) Höhn, Tr. Pers., *Trichothecium roseum* Link., and *Curculio elephas* Gill., and *Cydia splendana* Hb.

**Keywords:** sweet chestnut, fruit quality, storage, pathogenic fungi, insects, molecular detection