Morfološka obilježja i rast izolata gljive Hymenoscyphus fraxineus (T. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya pod djelovanjem ultravioletnih zraka svjetlosti

Damić, Mauro

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:108:834982

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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



Repository / Repozitorij:

University of Zagreb Faculty of Forestry and Wood Technology







ŠUMARSKI FAKULTET SVEUČILIŠTA U ZAGREBU

ŠUMARSKI ODSJEK

SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

URBANO ŠUMARSTVO, ZAŠTITA PRIRODE I OKOLIŠA

MAURO DAMIĆ

Morfološka obilježja rasta izolata gljive *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya prilikom izloženosti djelovanju ultraviolentnih zraka svjetlosti

DIPLOMSKI RAD

ZAGREB, 2016

ŠUMARSKI FAKULTET SVUČILIŠTA U ZAGEBU

ŠUMARSKI ODSJEK

Morfološka obilježja rasta izolata gljive *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya prilikom izloženosti djelovanju ultraviolentnih zraka svjetlosti

DIPLOMSKI RAD

Diplomski studj: Urbano šumarstvo, zaštita prirode i okoliša

Kolegij: Integrirana zaštita šuma u urbanim područjima

Ispitno povjerenstvo:

1. prof. dr. sc. Danko Diminić
2. dr.sc. Milivoj Franjević
3. Marno Milotić mag. ing. silv.

Student: Mauro Damić

JMBAG: 0068213107

Broj indexa: 521/14

Datum odobrenja teme: 11.04.2016

Datum predaje rada: 22.09.2016

Datum obrane rada: 23.09.2016

Zagreb, rujan 2016

Dokumentacijska kartica

Naslov	**Morfološka obilježja izolata gljive Hymenoscyphus fraxineus (T. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya prilikom izloženosti djelovanju ultraviolentnih zraka svjetlosti**
Title	Morphological characteristics and isolate growth of fungus Hymenoscyphus fraxineus (T. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya under the influence of ultraviolet light
Autor	Mauro Damić
Adresa autora	Stubica 8, Vrbovsko
Rad izrađen	Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Vrsta objave	Diplomski rad
Mentor	Prof. dr. sc. Danko Diminić
Izradu rada pomogao	Marno Milotić mag.ing.silv.
Godina objave	2016
Obujam	Broj stranica 54, slika 25, tablica 6, grafikona 5
Ključne riječi	*H. fraxineus*, Obični jasen, nekrotične lezije, patogen, izolacija, UVA
Keywords	*H. fraxineus*, Common ash, necrotic lesion, pathogen, isolation, UVA
Sažetak	*Hymenoscyphus fraxineus* značajan je patogen jasenovih sastojina koji se u posljednjih desetak godina značajno proširio zemljama Europe. U Hrvatskoj je bolest otkrivena 2009. godine u Gorskom kotaru na običnom jasenu (*Fraxinus excelsior* L.). U radu su izloženi podaci o patogenu kao i rezultati istraživanja u kojem se vršila izolacija patogena iz uzoraka tkiva zaraženih stabala običnog jasena. Dobiveni izolati podvrgnuti su utjecaju različitih ultraviolentnih zraka svjetlosti u vremenskom trajanju od 21 dan. Tijekom navedenog razdoblja mjeren je intenzitet rasta micelija gljive *Chalara fraxinea.* Dobiveni rezultati uspoređeni su skontrolnim izolatom koji je rastao u uvjetima potpunog mraka bez prisustva svjetlosti.

Sadržaj

1. UVOD....1
2. CILJ RADA....3
3.DOMAĆINI GLJIVE....4
3.1 Obični jasen, bijeli jasen *(Fraxinus excelsior* L.*)*....4
3.1.1. Biologija vrste običnog jasena....4
3.1.2. Morfologija vrste običnog jasena....5
3.1.3. Rasprostanjenost vrste *F. excelsior*....6
3.1.4 Tradicionalna i moderna upotreba običnog jasena....6
3.2. Poljski jasen (*Fraxinus angustifolia* Valh.)....7
3.2.1. Biologija vrste poljskog jasena....8
3.2.2. Morfologija vrste poljskog jasena....8
3.2.3. Rasprostranjenost poljskog jasena....9
3.2.4 Tradicionalna i moderna upotreba poljskog jasena....10
3.3. Crni jasen (*Fraxinus ornus* L.)....10
3.3.1. Biologija vrste crnog jasena....10
3.3.2. Morfologija vrste crnog jasena....11
3.3.4 Tradicionalna i moderna upoteba crnog jasena....12
4. UZROČNIK ODUMIRANJA JASENA....14
4.1 Otkriće i epidemiologija gljive *Hymenoscyphus fraxineus*....14
4.2.Taksonomija gljive....16
4.3. Biologija vrste....17
4.3.1. Telemorfni stadij....17
4.3.2 Anamorfni stadij....19
4.4. Simptomi bolesti....20
6. BOLEST PROPADANJA (ODUMIRANJA) JASENA U HRVATSKOJ....23
7. MATERIJALI I METODE....27
7.1. PROCJENA VITALNOSTI I OŠTEĆENOSTI STABALA....27
7.2. UZORKOVANJE....28
7.2.1. Priprema umjetnih hranjivih podloga....29
7.3. OZNAČAVANJE UZORAKA....32
7.4. POVRŠINSKA STERILIZACIJA UZORAKA....33
7.5. IZOLACIJA PATOGENA....35
7.6. APLIKACIJA ULTRAVIOLENTNOG SPEKTRA SVJETLOSTI....38

7.7. PODRUČJE RADA 39
8. REZULTATI 44
9. ZAKLJUČAK 49
10. DISKUSIJA 50
11. LITERATURA 52

Kazalo slika

Slika 1 Obični (bijeli) jasen (*Fraxinus excelsior* L.) 5
Slika 2. Rasprostanjenost običnog (bijelog) jasena na području Europe 6
Slika 3 Izbojak poljskog jasena (*Fraxinus angustifolia* Valh.) 9
Slika 4. Prirodna rasprostanjenost poljskog jasena (*F. angustifolia* Valh.) 9
Slika 5. List i cvat crnog jasena (*Fraxinus ornus* L.) 11
Slika 6. Prirodna rasprostanjenost crnog jasena (*Fraxinus ornus* L.) 12
Slika 7. Vremenska razdoblja otkriće gljive Hymenoscyphus fraxineus po državama te prikaz rasprostranjenosti običnog jasena (Fraxinus excelsior) u Europi 15
Slika 8. Plodna tijela gljive *Hymenoscyphus fraxineus* na peteljkama listova običnog jasena 17
Slika 9. Životni ciklus gljive *Hymenoscyphus fraxineus* 19
Slika 10. Žarište i demarkacijske zone zarazom gljive *Hymenoscyphus fraxineus* u Hrvatskoj 26
Slika 11. Simptomi *H. fraxineus* 28
Slika 12. Malt ekstrakt agar i potato dextrose agar 31
Slika 13. Sterilizirani Malt ekstrakt agar 31
Slika 14. Sterilizirani Potato dextrose agar 31
Slika 15. Uzorci običnog jasena u plastičnim vrećicama 32
Slika 16. Selekcija i tipiziranje uzoraka u Laboratoriju Šumarskog fakulteta 33
Slika 17. Površinska sterilizacija uzorka u 90% etanolu 34
Slika 18. Sušenje uzoraka običnog jasena (*F. excelsior*) u besprašnoj komori 35
Slika 19. Izolacija patogena, nanošenjem uzoraka na umjetnu hranjivu podlogu 36
Slika 20. Pojava micelija Chalara fraxinea – e nakon 2 – 3 tjedna 36
Slika 21. Primjer presadnje patogena za dobivanje čistih kultura 38
Slika 22. Geografski položaj Općine Brinje 40
Slika 23. Geografski položaj Ivanščice 41
Slika 24. Geografski položaj grada Nova Gradiška 42
Slika 25. Satelitski snimak geografskog položaja Zalesine 43

Kazalo tablica

Tablica 1 Sistematika *Fraxinus excelsior* L. (Cronquist, 1981; Mrmić,2012) 4
Tablica 2. Sistematika poljskog jasena 7
Tablica 3. Sistematika *Fraxinus ornus* L. 10
Tablica 4. Sistematika telemorfnog stadija gljive *H. fraxineus* 16
Tablica 5. Lokaliteti istraživanja sa navedenim vrstama domaćina, broj obavljenih pregleda, uzetih uzoraka te pozitivnih analiza 25
Tablica 6. Primjer praćenja rasta micelija gljive *C. fraxinea* tijekom 3 tjedna 44

Kazalo grafikona

Grafikon 1. Intenzitet rasta micelija gljive *C.fraxinea* na umjetnoj hranjivoj podlozi, pod utjecajem svjetlosti vidljivog spektra.....45
Grafikon 2. . Intenzitet rasta micelija gljive *C. fraxinea* na umjetnoj podlozi pod utjecajem UVA svjetlosti 46
Grafikon 3. Intenzitet rasta micelija gljive *C. fraxinea* na umjetnoj podlozi pod utjecajem UV B svjetlosti 47
Grafikon 4. Usporedba rasta micelija gljive *C. fraxinea* pod utjecajem različitih ultraviolentnih zraka svjetlosti.....47
Grafikon 5. Usporedba intenziteta rasta micelija gljive C.fraxinea pod utjecajem različitih UV zraka svjetlosti i kontrole 48

ZAHVALA

U prvom redu zahvaljujem svom mentoru prof. dr.sc. D. Diminiću, asistentici J. Kranjec, mag.ing.silv., a posebno asistentu M. Milotiću, mag. ing.silv. na bezrezervnoj pomoći i potpori koju su mi pružili tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Također, zahvaljujem se svim svojim dragim prijateljima i prijateljicama, kolegama i kolegicama što su uvijek bili uz mene i učinili tijek mog studiranja lakšim i zabavnijim.

Posebnu zahvalost upućujem svojoj obitelji koja me cijelo vrijeme podržavala i upućivala na pravi put.

I na kraju, neizmjernu zahvalnost upućujem svojim roditeljima i bratu što su uvijek bili uz mene kad mi je trebalo, što su mukotrpno radili da mi stvore uvjete za studiranje i što su u svim za mene teškim trenucima bili moja najveća podrška i snaga. Bez Vas sve što sam do sad postigao nebi bilo moguće.

Ovaj diplomski rad posvećujem Vama!

Velika HVALA svima!

1. UVOD

Posljednjih godina došlo je do pojave značajnog odumiranja jasena diljem Europe čiji se uzrok krije iza patogena pod nazivom *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya. Napad ove gljive zabilježen je na običnom jasenu (*Fraxinus excelsior* L.), na poljskom jasenu (*Fraxinus angustifolia* Valh.), a osjetljivost također ispoljava i crni jasen (*Fraxinus ornus* L.)(Drenkhan i Haso, 2010). Praćenjem stanja šuma na području Republike Hrvatske uočene su značajne štete na sastojinama jasena, a koje su površinom najveće u gorskim i kontinentalnim područjima.

Simptomatski ova gljiva pokazuje svoje prisustvo nekrozom lišća, pojavom nekrotičnih lezija na grančicama i stabljikama mladih biljaka koje postupno uzrokuju venuće i odumiranje izbojka. Lezije se najčešće vide u dnu mrtvih postranih izbojaka, te na nasuprotnim granama ili deblu (Kowalski i Bartnik,2010). Na inficiranim odraslim stablima najprije odumiru izbojci i grančice na periferiji krošanja. Nekroze kore koje uzrokuje spomenuta gljiva karakteristično su tamno do crvenkasno smeđe boje. Apoteciji se razvijaju u listincu tijekom ljeta na otpalim prošlogodišnjim lisnim peteljkama – rahisima (Kirisits i Cech, 2009; Kowalski i Holdenrieder, 2009b). Iz apotecija askospore nošene vjetrom padaju na površinu lista te uz pomoć sluzi prijanjaju za njegovu površinu. Zaražene hife tada prodiru u stanice epiderme lista, a nakon 10 – 14 dana od infekcija vidljivi su prvi simptomi na listovima. Infekcija se može širiti dalje u peteljke (Kiristis et al.,2009), iz peteljka u izbojke te dalje u grančice, grane i deblo. Nesavršeni, anamorfni stadij gljive *Chalara fraxinea* pojavljuje se tijekom jeseni i zime na peteljkama lišća u listincu, većinom u blizini nastanka pseudosklerocija (Kowalski i Bartnik, 2010). Za navedene simptome i odumiranje jasena odgovoran je upravo anamorfni stadij *Chalara fraxinea* T. Kowalski (Kowalski 2006.) gljive *Hymenoscyphus fraxineus*.

Bolest napada stabla običnog i poljskog jasena svih dobi neovisno o tipu staništa na kojem pridolaze, kao i stabla u urbanim sredinama, rasadnicima te prirodnim sastojinama. Upravo ta činjenica potakla je mene kao autora ovog rada da

neposredno prikažem ozbiljnost ove bolesti te pokušam ukazati na eventualne načine kontrole ove bolesti.

Kako se u novije vrijeme mnogi znanstvenici bave upravo proučavanjem gljive *Hymenoscyphus fraxineus,* te na brojne načine pokušavaju shvatiti što točno pogoduje napadu ovog patogena i zašto gljiva uzrokuje toliku smrtnost stabala koje napadne odlučio sam relativno klasičnim tehnikama vizualnog pregleda zaraženih stabla, uzorkovanjem istih te daljnjim laboratorijskim postupcima dovesti do novih spoznaja i rezultata koji bi pomogli pri suzbijanju navedenog patogena i smanjenju šteta koje uzrokuje, a postupcima koji će biti ekološki prihvatljivi.

Kolonije gljive *C. fraxinea* uzgojene *in vitro* pokazuju znatne varijacije, prvenstveno u boji i strukturi. Temperatura ima znatan utjecaj na morfološke karakteristike gljive uzgojene *in vitro.* Optimalna temperatura za rast gljive *Chalara fraxinea* je između 20 – 25 °C, dok više temperature mogu inhibitorno djelovati na rast gljive (Blenis et al. 1984; Domanski i Kowalski, 1988; Butin 1996).

UV svjetlo ima vrlo važnu ulogu u razvoju apotecija. Važnost UV zraka svjetlosti u razvoju apotecija demonstrirana je u različitostima askomiceta (Leach, 1971), a osim UV svjetlosti vrlo važnu ulogu ima i vlaga zraka.

Kako se bolest vrlo brzo proširila područjem oko Hrvatske bilo je neophodno provesti brojna istraživanja i na Šumarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Bolest je 2006. godine otkrivena na području sjevero – istočne Slovenije, no dvije godine nakon otkrića utvrđeno je njeno širenje na područje čitave zemlje (Ogris et al., 2010), a 2012. godine patogen je potvrđen i u Hrvatskoj (Barić et al., 2012).

Uzorci korišteni u ovom radu uzeti su s pet hrvatskih i pet belgijskih lokacija u razdoblju od 1.rujna do 31.listopada 2015 godine. Lokacije s kojih su uzorci uzimani prijavljene su kao jedna od najvećih žarišta napada ove gljive u Hrvatskoj, a također povezano s napadom radi se o lokacijama s površinski najvećim sastojinama jasena.

Da bismo shvatili biologiju gljive, brzinu širenja, te samim tim i načine suzbijanja šteta potrebno je vršiti nova istraživanja i nova uzorkovanja u svrhu dobivanja podataka koji će se koristiti u daljnim naporima kako bi štete bile minimalizirane.

2. CILJ RADA

Fitopatogena gljiva *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya 2014 značajan je patogen jasenovih sastojina *(Fraxineus spp*.) u Europi. Tijekom izrade ovog diplomskog rada obavljena je izolacija patogena iz uzoraka tkiva zaraženih stabala običnog (*Fraxinus excelsior L*.) te poljskog (*Fraxinus angustifolia* Valh.) jasena. Izolati patogena korišteni su u pokusima rasta i razvoja gljive na hranidbenoj podlozi pri djelovanju različitih valnih duljina ultraviolentne svjetlosti. Postavljenim pokusima pokušati ću pokazati eventualni utjecaj različitog spektra UV svjetlosti na razvoj gljive te simulaciju utjecaja svjetlosti u prirodnim uvjetima kao i mogućnosti upotrebe istih valnih duljina u biološkoj kontroli patogena.

3.DOMAĆINI GLJIVE

Fitopatogena gljiva *Hymenoscyphus fraxineus* potvrđena je u prirodnim uvjetima na svim autohtonim vrstama jasena u Hrvatskoj, dok su infekcije na crnom jasenu moguće zasad jedino umjetnim inokulacijama.

3.1 Obični jasen, bijeli jasen *(Fraxinus excelsior* L.*)*

Carstvo	Plantae
Pododjeljak	Magnoliophyta – kritosjemenjače
Razred	Magnoliopsida – dvosupnice
Red	Oleales
Porodica	Oleaceae
Rod	Fraxinus
Vrsta	Fraxinus excelsior

Tablica 1 Sistematika *Fraxinus excelsior* L. (Cronquist, 1981; Mrmić,2012)

3.1.1. Biologija vrste običnog jasena

Obični jasen (*Fraxinus excelsior* L.) je listopadna i anemofilna vrsta. U mladosti raste dosta brzo. Ima izdanačku snagu iz panja, ali iz korjena ne. Cvjeta tijekom IV. i V. mjeseca, prije listanja. Plodovi sazrijevaju tijekom IX. i X. mjeseca, a opadaju tijekom zime sve do proljeća. Razmnožava se sjemenom. Preferira dovoljno vlažna, svježa i hranjivima bogata tla, najčešće u gorsko – planinskom području. U području bukovih šuma, pod specifičnim mikrostanišnim uvjetima raste u zajednici sa gorskim javorom, mliječom i gorskim brijestom (Franjić i Škvorc, 2010).

3.1.2. Morfologija vrste običnog jasena

Raste kao stablo do 40 m visine, s promjerom i do 1 m, s dosta pravilnom, svijetlom krošnjom, dugačkim i jakim granama, usmjerenim prema vrhu. Kora je na mladim granama glatka i zelenkasto siva, a u starijih stabala i odebljala, tamna, duboko uzdužno i plitko poprečno izbrazdana. Korjenov sustav je vrlo razvijen i razgranat, s bočnim žilama koje daleko pružaju. Pupovi su većinom nasuprotni, kratko piramidalni, 1 - 1,5 cm dugi, pokriveni širokim ljuskama crne boje. Vršni pup je nešto krupniji. Listovi su neparnoperasti, do 25 cm dugi, na dugoj, pomalo užljebljenoj peteljci, a sastoje se od 7 – 13 (15) liski, koje su gole osim u pazušcu listova. Cvjetovi su skupljeni u guste, smeđaste metličaste cvatove, dvospolni, bez čaške i vjenčića, a pojedini cvjetovi su često jednospolni. U prirodi se mogu naći stabla samo s dvospolnim, samo s muškim i samo sa ženskim cvjetovima. Prašnici su tamnocrveni ili ljubičasti. Plod je krilata perutka, koja sadrži jednu sjemenku, ona je duga 20 – 35 centimetara i oko 8 mm široka, sjajna i smeđa (Franjić i Škvorc, 2010).



Slika 1 Obični (bijeli) jasen (*Fraxinus excelsior* L.)
(https://hr.wikipedia.org/wiki/Obi%C4%8Dni_jasen#/media/File:Fraxinus_excelsior_001.jpg)

3.1.3. Rasprostanjenost vrste *F. excelsior*

Bijeli jasen rasprostranjen je na području Europe, Krima te Kavkaza. Jedna je od najrasprostranjenijih vrsta Europe. Areal mu se proteže diljem Europe – od Atlantske obale na zapadu do kontinentalnog dijela Rusije, a na istoku se proteže gotovo do rijeke Volge.



Slika 2. Rasprostanjenost običnog (bijelog) jasena na području Europe

(FRAXIGEN, 2005)

3.1.4 Tradicionalna i moderna upotreba običnog jasena

Obični jasen je izuzetno važna vrsta šumskog drveća, sa specifičnim i atraktivnim blijedim ili ružičastobijelim drvom koje je dovoljno snažno, izdržljivo, elastično te lako savitljivo, što pogoduje izradi namještaja i upotrebi u izgradnji interijera različitih građevina, a najčešće obiteljskih kuća. Izdržljivost i elastičnost ove vrste šumskog drveća omogućuje istom veliku nosivost različitih težina, podnošenje napetosti te apsorbciju različitih stresnih abiotskih utjecaja, čime se ova vrsta razlikuje od ostalih europskih vrsta drveća. Prije početka intenzivne upotrebe željeza, drvo običnog

jasena koristilo se za mnoge stvari poput greda, koplja, grablji, osovina, kola te okvira za automobile i brodove. Najbolji trupci dobivaju se od stabala brzo uzgojenih na plodnom tlu. Stabla sa 4 do 16 godova unutar duljine od 25 mm povoljna su u većini slučajeva dok su sporo uzgojena stabla koriste za izradu furnira.

Obični jasen ima u svom deblu vrlo malu količinu vlage, što pogoduje korištenju ove vrste kao ogrjevno drvo, i to odmah nakon sječe. Nekada se drvo ove vrste koristilo i za proizvodnju ugljena. Listovi običnog jasena pokazuju veliku hranjivost što pogoduje prehrani biljojeda pa se isti mogu koristiti i kao stočna hrana. U medicini se nekada list ove vrste koristio za proizvodnju tonika protiv malarije.

Drvo *Fraxinus excelsiora* koristilo se također i za proizvodnju sportske opreme, posebno kod sportova gdje je izdržljivost, fleksibilnost te elastičnost opreme neophodna.

3.2. Poljski jasen (*Fraxinus angustifolia* Valh.)

Carstvo	Plantae
Pododjeljak	Magnoliophyta – kritosjemenjače
Razred	Magnoliopsida
Red	Oleales
Porodica	Oleaceae
Rod	Fraxinus
Vrsta	Fraxinus angustifolia

Tablica 2. Sistematika poljskog jasena

(https://hr.wikipedia.org/wiki/Poljski_jasen)

3.2.1. Biologija vrste poljskog jasena

Fraxinus angustifolia možemo pronaći kao čiste šuma ili mješovite šume s drugim listopadnim vrstama kao što su Quercus, Carpinus, Ulmus, Acer, Alnus, Populus, Salix, Platanus, Juglans, Tilia, Sorbusand Prunusspecies kao i s nizom manjih stabala uključujući Pyrus, Malus, Corylus, Tamarix, Cornus, Crataegus, Ligustrum, Rhamnus, Viburnum, Sambucusand Rosaspecies (FRAXIGEN, 2005).

Poljski je jasen listopadna, anemofilna i higrofilna vrsta. Cvjeta tijekom (III.) IV. i V. mjeseca, prije listanja. Razmnožava se sjemenom (Franjić i Škvorc, 2010).

3.2.2. Morfologija vrste poljskog jasena

Najčešće raste kao stablo visine oko 15 m, ali u povoljnim prilikama izraste i do preko 30 m i dostigne promjer oko 1 m. Krošnja je duguljasto ovalna, zaobljena, s relativno gustim granama. Kora debla je na početku glatka, tanka, kasnije odeblja i ispuca uzdužno i poprijeko u male višekutne pločice, i postane siva. Korjenov sustav je dobro razvijen i širok. Pupovi su manji nego u običnoga jasena, svjetlo do tamnosmeđi, rjeđe do zagasitocrnkasti, pustenasti. Terminalni pup je najveći, a bočni su vrlo često po 3 u pršljenu. Listovi su neparno perasti, sastavljeni od 7 (11) pari polimorfnih liski koje su 1 – 10 cm duge, 0,5 – 3 cm široke, s gornje strane gole, a s donje strane uz glavnu žilu s čupercima svjetlosmeđih dlačica ili gole. Na rubu su nejednoliko, krupno i nepravilno pilaste. Cvjetovi su bez čaške i vjenčića, nalaze se u rastresitim, razgranatim, metličastim cvatovima (znatno dužim nego u običnoga jasena); crvenkastosmeđe boje. Cvjetovi su dvospolni, a ponekad i jednospolni. U prirodi se mogu naći stabla samo s dvospolnim, samo s muškim i samo sa ženskim cvjetovima. Plod je smeđa perutka s ušiljenim, zaokruženim ili izrubljenim vrhom koja je u osnovi klinasta. Sjemenke su uvijek duže od polovine perutke, dok su u običnoga jasena jednake ili manje od polovine perutke (Franjić i Škvorc, 2010).

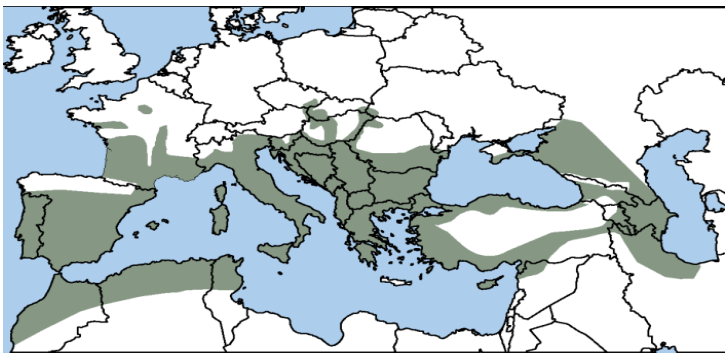


Slika 3 Izbojak poljskog jasena (*Fraxinus angustifolia* Valh.)

(https://hr.wikipedia.org/wiki/Poljski_jasen)

3.2.3. Rasprostranjenost poljskog jasena

Poljski jasen (*Fraxinus angustifolia* Vahl.) rasprostranjen je na području Europe (Mediteran, Panonija), zapadne Azije i sjeverne Afrike. Distribucija poljskog jasena proteže se od Španjolske i Portugala na zapadu do Slovačke i južne Moravije na sjeveru do Turske na istoku, Sirije, Irana i južne Rusije. U središnjoj Europi, Panonskoj nizini i na Balkanu, uglavnom se pojavljuje u nizinskim i obalnim šumama. Dakle, najčešće se javlja uz tokove rijeka Jadranskog sliva i u panonskim nizinskim šumama.



Slika 4. Prirodna rasprostanjenost poljskog jasena (*F. angustifolia* Valh.)

3.2.4 Tradicionalna i moderna upotreba poljskog jasena

Poljski jasen (*Fraxinus angustifolia* Valh.) je vrlo važna vrsta šumskog drveća, a svojstvima i kakvoćom debla vrlo slična običnom jasenu. Kvaliteta drveta poljskog jasena varira ovisno o staništu na kojem je stablo raslo, tako je kvalitetnije stablo uzgojeno na suhljem staništu koje mu ekološki više i odgovara.

Lišće ove vrste također pokazuje veliku hranjivost pa se koristilo kao krmno bilje za prehranu stoke. Isto tako, lišće poljskog jasena sastavni je dio prehrane pojedinih vrsta divljači koje obitavaju u području rasta poljskog jasena (srna, jelen).

U mnogobrojnim zemljama Europe poljski jasen se koristi i kao ukrasna vrsta na ulicama gradova.

3.3. Crni jasen (*Fraxinus ornus* L.)

Carstvo	Plantae
Pododjeljak	Magnoliophyta - kritosjemenjače
Razred	Magnoliopsida
Red	Oleales
Porodica	Oleaceae
Rod	Fraxinus
Vrsta	Fraxinus ornus L.

Tablica 3. Sistematika *Fraxinus ornus* L.

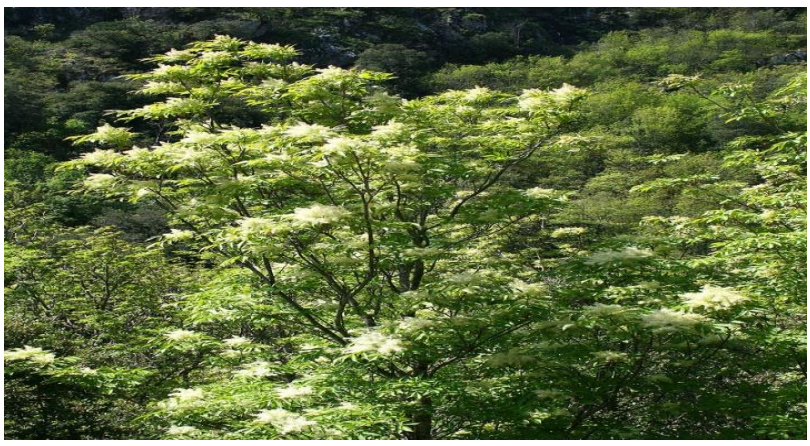
3.3.1. Biologija vrste crnog jasena

Crni jasen (*Fraxinus ornus* L.) je listopadna, entomofilna, kserotermofilna i heliofilna vrsta. Cvjeta početkom V. mjeseca, istovremeno s listanjem (2 – 3 tjedna poslije bijeloga jasena). Plodovi sazrijevaju tijekom IX. mjeseca i opadaju zimi. Razmnožava se sjemenom. Ima vrlo jaku izdanačku snagu iz panja. Prema obliku i veličini liski opisan je veći broj varijeteta i formi, a zbog obilnog cvjetanja često se uzgaja u vrtovima i parkovima. (Franjić i Škvorc, 2010)

F. ornus nalazimo na nadmorskim visinama do 1500 m.n.v. Zahtjeva visoke temperature, a u sjevernom dijelu svog prirodnog područja rasprostranjenosti raste uglavnom na toplim južnopozicioniranim padinama. Optimalna količina oborina za njegov razvoj iznosi 500 – 650 mm (FRAXIGEN, 2005).

3.3.2. Morfologija vrste crnog jasena

Crni jasen (*F. ornus* L.) se javlja sve od razine mora do duboko u unutrašnjost, najčešće raste u šumama hrasta crnike (*Q. ilex*) i mješovitim šumama hrasta medunca (*Q. pubescens).* Raste kao grm ili stabalce oko 8 (15) m visine. Kora je svjetlosiva tanka, u starijoj dobi malo pri dnu ispuca. Jednogodišnji izbojci su maslinasto smeđi ili sivozeleni. Korjenov sustav je plitak i vrlo razgranjen. Pupovi su srebrnastosivi do smeđi, nasuprotni do fino pustenasti. Bočni su manji sa dvije ljuske, a terminalni konični s 4 ljuske. Listovi su neparnoperasti; sastavljeni od 5 – 9 eliptičnih ili jajastih liski koje su po rubu pilaste. Oko glavnih i bočnih žila odozdo su rđasto dlakave. Cvjetovi su bijeli u uspravnim, kasnije visećim, složenim metlicama, dugim oko 20 centimetara, ugodnoga mirisa. Cvjetovi su obično dvospolni ili ženski. Plod je duguljasta perutka od 3 cm duga, u presjeku okrugla i smeđa (Franjić i Škvorc, 2010)

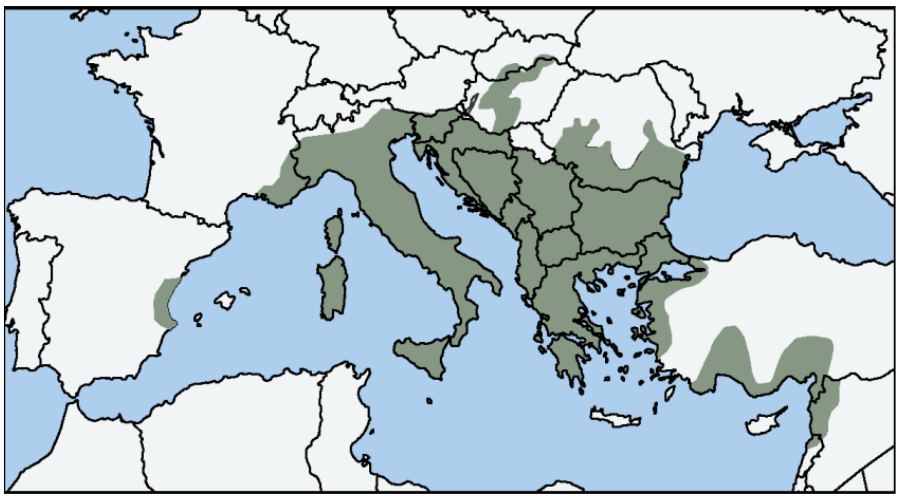


Slika 5. List i cvat crnog jasena (*Fraxinus ornus* L.)

3.3.3. Rasprostranjenost vrste crnog jasena

Fraxinus ornus L. rasprostanjen je na području južne Europe i zapadne Azije. Najveća zastupljenost navedene vrste je u Italiji (uglavnom na jugu i otocima Meridijana), Grčkoj te u krškim područjima Balkanskog poluotoka i zapadne Turske. Neke izolirane vrste možemo pronaći i u istočnoj Španjolskoj.

Pridolazi na najčešće suhim staništima s bazičnom i neutralnom reakcijom. Staništa su u kontinentalnim krajevima uvjetovana mikroreljefom i edafskim čimbenicima. To su prvenstveno toplije ekspozicije s kamenitim ili plitkim skeletnim tlom (Franjić i Škvorc, 2010).



Slika 6. Prirodna rasprostanjenost crnog jasena (*Fraxinus ornus* L.)

(FRAXIGEN, 2005)

3.3.4 Tradicionalna i moderna upoteba crnog jasena

Crni jasen nije toliko važna vrsta šumskog drveća kao obični i poljski jasen. Stablo crnog jasena nikada ne dosegne velike dimenzije, kako u promjeru, tako ni u visinu. Deblo u poprečnom presjeku ima karakteristične veoma uske godove koji se pojavljuju u velikom broju s malim razlikama u žućkastoj boji između srži i rubnog dijela. Drvo je lakše nego u navedene dvije vrste roda *Fraxinus.* Crni jasen se koristi i danas kao komponenta za izradu različitih alata, košarica te predmeta za

domaćinstva, no isto tako ima važnu ulogu u prehrani stoke na područjima Mediterana.

Ova vrsta jasena izvor je mane, odnosno materijala koji nastaje kada se tekućina koja izađe iz kore mladih stabala osuši na suncu, a koja se koristi u medicini prvenstveno kao laksativ. Prvotno se mana prikupljala iz oštećenih stabala, no kasnije u Italiji i Siciliji dolazi do otvaranja plantaža koje su se koristile prvenstveno za njenu proizvodnju. Mana se i danas proizvodi na Siciliji, u području Castelbuono i Pollina. Proizvodnja mane započinje tek kada stabla postanu starosne dobi od 8 – 10 godina i imaju promjer debla od 8 cm.

4. UZROČNIK ODUMIRANJA JASENA

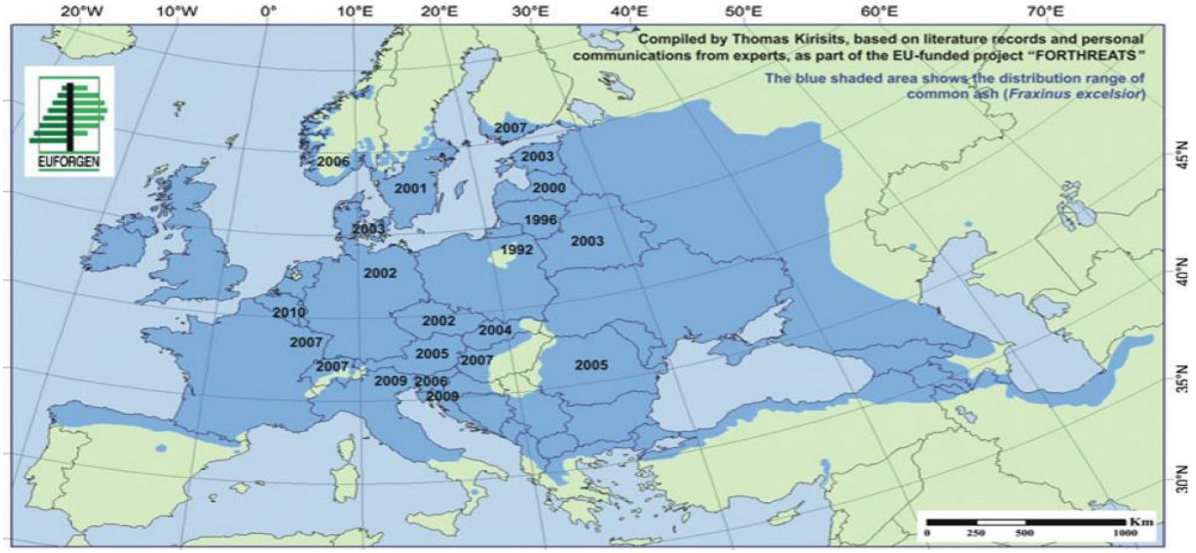
4.1 Otkriće i epidemiologija gljive *Hymenoscyphus fraxineus*

Masovna propadanja prvotno su otkrivena na običnom jasenu (*F. excelsior* L.). Prvi simptomi propadanja jasena otkrivena su u Poljskoj 1992. Godine (Przybyl, 2002), a nedugo nakon toga i u sjevernoj, zapadnoj te južnoj Europi. U Danskoj je ovaj patogen otkriven 2003.godine. Simptomi napada pripisani su patogenoj gljivi, anamorfnog stadija *Chalara fraxinea* T. Kowalski (Kowalski 2006; Bakys et al. 2009; Kowalski i Holdenrieder 2009). Prvi je navednu gljivu otkrio T. Kowalski na području Poljske (Kowalski 2001). Kako uzročnika bolesti nije mogao pripisati niti jednoj vrsti roda *Chalara,* Kowalski opisuje novu vrstu anamorfne gljive *Chalara fraxinea* T. Kowalski (Kowalski 2006). Tri godine nakon otkrića anamorfnog stadija navedene gljive, otkriven je i telemorfni stadij patogena pripisan vrsti *Hymenoscyphus albidus* (Roberge ex. Desm.) W. Phillips (Kowalski i Holdenrieden 2009). Ta vrsta do tada je bila opisana kao saprofitska gljiva, a ne kao uzročnik odumiranja jasena. Nakon brojnih istraživanja, utvrđeno je da se radi o dva morfološki slična, ali ipak različita patogena. *Hymenoscyphus albidus* tada je izolirana s zdravih stabala u jasenovim sastojinama diljem Europe te potvrđena kao autohtona i široko rasprostranjena, a uzorcima zaraženih stabala i njihovom izolacijom potvrđeno je otkriće novog patogena nazvanog *Hymenoscyphus pseudoalbus*, danas zvanoj *H. fraxineus.* Molekularnim istraživanjima vrsta roda *Hymenoscyphus* i vrsta roda *Chalara* (Relova et al.,2011) utvrđeno je da ta dva roda zapravo nisu sinonimi. Kako je gljivi uzročniku odumiranja jasena, utvrđena bliskost s vrstama roda *Hymenoscyphus* (Zhao et al.,2012) ona je i uvrštena u taj rod, te *Hymenoscyphus* postaje službeni naziv roda. Obzirom da je „fraxinea“ stariji i uvriježeni epitet, on se pridodaje taksonomski točnom redu *Hymenoscyphus* (Baral et al., 2014) te je točan znanstveni naziv gljive koja uzrokuje odumiranje običnog jasena diljem Europe *Hymenoscyphus fraxineus*. U Austriji je patogen i odumiranje jasena otkriveno 2005 (Cech, 2006) te je od 2006 do 2007. godine gljiva počela predstavljati veliku opasnost sastojinama jasena na tom području. 2007. godine patogen je prvi put izoliran s stabala na kojima su uočeni početni simptomi bolesti, a 2008. godine potvrđena je na 11 lokacija diljem Austrije. Bolest se širila vrlo brzo tako je od istočne Poljske pa do Švicarske došla za svega

16 godina čime je potvrđeno kako se širi znatno brže od nekih do tada proširenijih i poznatijih patogena.

Kada govorimo o rasprostranjenosti i brzini širenja gljive *Hymenoscyphus fraxineus* kako je već navedeno gljiva je početkom 90-tih godina otkrivena u Poljskoj, a vrlo brzo nakon toga patogen je potvrđen i u Njemačkoj i Danskoj. Gljiva je 2002. godine potvrđena na jugu Švedske, no već 2004. godine primjećena je diljem zemlje i okarakterizirana je kao široko rasprostranjena. Danas se može reći kako je ovaj patogen, uzročnik odumiranja jasena, rasprostranjen diljem Europe i čini znatne štete na jasenovim sastojinama. Na području Hrvatske gljiva je okarakterizirana kao rasprostranjena i invanzivna, u Belgiji je mjestimično rasprostranjena, te je također invazivna (Chandelier et al., 2011)

U Hrvatskoj je gljiva prvi put otkrivena 2009. godine na običnom jasenu, na području Gorskog kotara (Barić i Diminić, 2010).



Slika 7. Vremenska razdoblja otkriće gljive Hymenoscyphus fraxineus po državama te prikaz rasprostranjenosti običnog jasena (Fraxinus excelsior) u Europi

(Timmenman et al., 2011)

4.2.Taksonomija gljive

Bolest uzrokovana patogenom *Hymenoscyphus fraxineus* čiji anamorfni stadij uzorkuje odumiranje stabala jasena diljem Europe.

Rod *Hymenoscyphus* pripada porodici *Helotiaceae,* reda *Heliotales*, razredu *Leotiomycetes*, unutar koljena *Ascomycota* te carstvu *Fungi.* Većina vrsta ovog roda opisane su kao saprofitne, a prije odumiranja običnog jasena niti jedna nije opisana kao fitopatogena vrsta (Wang i sur. 2006).

Sistematika (rang)	**Takson**
Carstvo	Fungi
Koljeno	Ascomycota
Razred	Leotyomicetes
Red	Helotiales
Porodica	Helotiaceae
Rod	Hymenoscyphus
Ime i autor	Hymenoscyphus fraxineus (T. Kowalski), Baral, Queloz, Hosoya

Tablica 4. Sistematika telemorfnog stadija gljive *H. fraxineus*

4.3. Biologija vrste

Fitopatogena gljiva koju obrađujem u ovom radu ima u svom razvojnom ciklusu dva stadija: telemorfni stadij *Hymenoscyphus fraxineus,* te anamorfni stadij *Chalara fraxinea.* Njihove karakteristike biti će opisane u nastavku.

4.3.1. Telemorfni stadij

Životni ciklus gljive *Hymenoscyphus fraxineus* započinje na listu jasena. Apoteciji se razvijaju na prošlogodišnjim lisnim peteljkama u listincu tijekom ljeta (Kiristis i Cech, 2009; Kowalski i Holdenrieder, 2009b; Timmermann et al., 2010).



Slika 8. Plodna tijela gljive *Hymenoscyphus fraxineus* na peteljkama listova običnog jasena (http://asco-sonneberg.de/pages/gallery/hymenoscyphus-pseudoalbidus-110718-01xs21091.php; autor fotografije: Michelle Cleary)

Sporulacija se odvija od lipnja do rujna a u određenim okolnostima počinje ranije te traje do listopada (Hietala i sur., 2013, Kirstis i Cech, 2009; Kowalski i Holdenrieder, 2009b, Timmerman et al. 2011). Veća vlažnost uzrokovana povišenom količinom oborina, te više temperature zraka pogoduju oslobađanju askospora i stvaraju

idealne uvjete za veću mogućnost infekcije. Spore su anemofilne, te raznesene vjetrom prijanjaju na površinu lista uz pomoć sluzi. Navedena sluz je više manje prozirna oko spore no značajno je tamnija oko formiranog apresorija na celofanu na podlozi od jasenovog lista. Na celofanu postavljenom na vodenu podlogu, sluz nije vidljiva. Sluz, koja najvjerojatnije nastaje oko apresorija, u kontaktu s kutikulom lista, mijenja strukturu kutikule. Navedenim načinom prijanjanja djelomično razara kutikulu te se ona raspada i pripomaže da zaražena hifa prodire u stanice epiderme. Hife, prilegle uz kutikulu, šire se po površini lista i prodiru u puči. Na epidermalnim stanicama vide se nekroze kao jasno ocrtana oštećenja u kojima su stanične stjenke izgubile volumen i oblik (Cleary et al., 2013).

Kutikula se djelomično raspada te infekciona hifa prodire u stanice epiderme. Nekroza se zatim širi lisnim žilama uzrokujući raspadanje kutikule i staničnih stijenki epiderme, a iz nakupina hifa nastalih iz jedne ili više askospora, intenzivno se razvija micelij (Cleary et al. 2013).

Nekroze i oštećenja listova vidljivi su 10–14 dana od infekcije patogenom (Cleary et al. 2013). Mikroskopskim pregledom zaraženog lista, hife su nađene u epidermalnim i mezofilnim stanicama, te u provodnom snopu lista. Citoplazma i stanične stijenke većinom su raspadnute.

Pregledom zatamnjelih i promjenjenih dijelova peteljke, hife su u velikom broju nađene u ksilemu, floemu te parenhimskim stanicama tkiva (Cleary et al. 2013). Dokazano je da se patogen ponekad može proširiti iz peteljke u izbojak, gdje također uzrokuje nekrozu no to uglavnom predstavlja završetak životnog ciklusa gljive, jer je fruktifikacija na mrtvim izbojcima izrazito rijetka (Kiristis i Cech, 2009, Kiristis et al., 2012, Kowalski i Holdenrieder 2009). Nakon ostvarene infekcije micelij se širi u sve stanice biljke, u svim smjerovima i u sve tipove tkiva domaćina.

U jesen nakon što lišće otpadne s jasenovih stabala, patogen počinje stvarati karakterstične crne pseudosklerocije na peteljkama, a ponekad i na lisnim žilama i malim izbojcima. U sljedećem vegetacijskom razdoblju i nakon dvije pa čak i tri godine nakon otpadanja lista, na navedenim pseudosklerocijama počinju se stvarati apoteciji te je time razvoj gljive završen (Gross i Holdenrieder, 2013.)



Slika 9. Životni ciklus gljive *Hymenoscyphus fraxineus*

4.3.2 Anamorfni stadij

Anamorfni stadij javlja se tijekom jeseni i zime na peteljkama u listincu, većinom u blizini nastanka pseudosklerocija (Kowalski i Bartnik, 2010). S obzirom da fijalokonidije ne mogu klijati na različitim podlogama i s obzirom da su vrlo sićušne, smatra se da one služe kao spermacije. One ne mogu izazvati infekciju, ali imaju značajnu ulogu u izmjeni jezgara tijekom spolne reprodukcije (Kiristis i sur., 2009). Jedan od indirektnih dokaza za ovu ulogu konidija je roditeljska analiza različitih apotecija s jedne peteljke gdje nisu sva nasljeđena roditeljska svojstva nađena na istoj peteljci. Stoga do oplodnje je moralo doći prijenosom spermacija s druge peteljke (Gross et. al., 2012). Ovaj stadij je još vrlo neistražen i pun nepoznanica, tako je nepoznato ni u kojem dijelu godine dolazi do oplodnje, no peteljke s

pseudosklerocijama sakupljene u siječnju 2013 u Zurichu i držane na 20 °C razvile su mnogobrojne plodne apotecije unutar 4 tjedna (Holdenrieder, neobjavljeno).

4.4. Simptomi bolesti

Simptomi bolesti koje uzrokuje fitopatogena gljiva *Chalara fraxinea* su raznoliki i uzrokuju odumiranje i propadanje stabala svih dobi i na svim staništima, neovisno o uvjetima staništa ili metodama gospodarenja (Bakys i sur., 2009; Kowalski 2006; Schumacher i sur., 2010).

Prvi uočljivi simptomi bolesti su male nekrotične lezije, smečkasto crne boje, bez sluzi, na peteljkama i žilama lista koje se šire i uzrokuju njegovo venuće i otpadanje (Bakys et. al., 2009; Kirstis et al. 2009, Kraulter i Kirstis, 2012). Osim navedenih simptoma odumiranja i venuća lišća i izbojaka, karakteristični simptomi ove bolesti su i smeđe lezije koje se nalaze na kori, najčešće na spoju s oboljelim izbojkom ili oko lisnog ožiljka, koje se često šire i prstenuju izbojak. Nekrotizirani dijelovi kore mogu se razlikovati u boji i veličini, ali se uvijek pojavljuju bez sluzastih izlučevina na granama i deblu (Kowalski, 2006). Ispod nekroze kore vidljiva je sivkastosmeđa diskoloracija drva (Kiristis i sur., 2009) koja se često širi do ksilema (Schumacher i sur. 2010). Tako zaražena stabla često dobivaju nove izbojke zbog čega krošnja poprima karakterističan, neuredan izgled, tipičan za napad ove gljive.

Kod napada ove gljive mlada stabla odumiru za svega nekoliko godina od početka infekcije dok kod starijih stabala bolest poprima kroničan karakter, sustavno oslabljujući stablo koje nakon nekog vremena postaje fiziološki slabo te osjetljivo za napad sekundarnih gljiva i štetnika.





Fotografije 1 i 2 prikazuju karakteristične mrtve vršne ili postrane izbojke te lezije koje se najčešće vide u dnu mrtvih postranih izbojaka, te na nasuprotnim granama

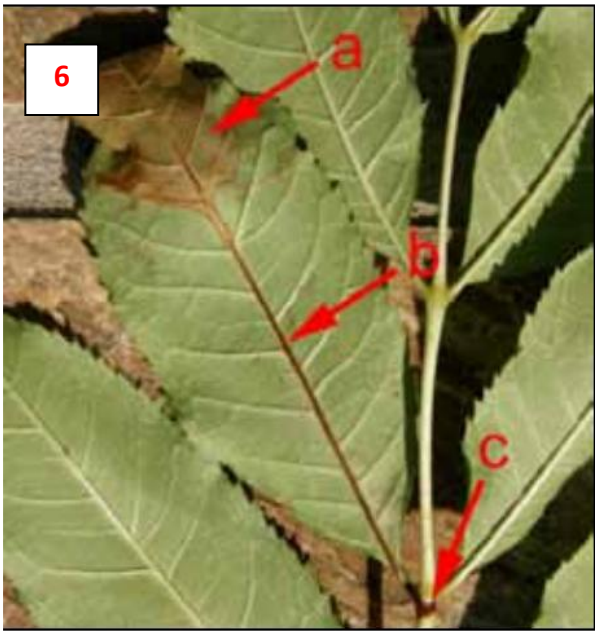


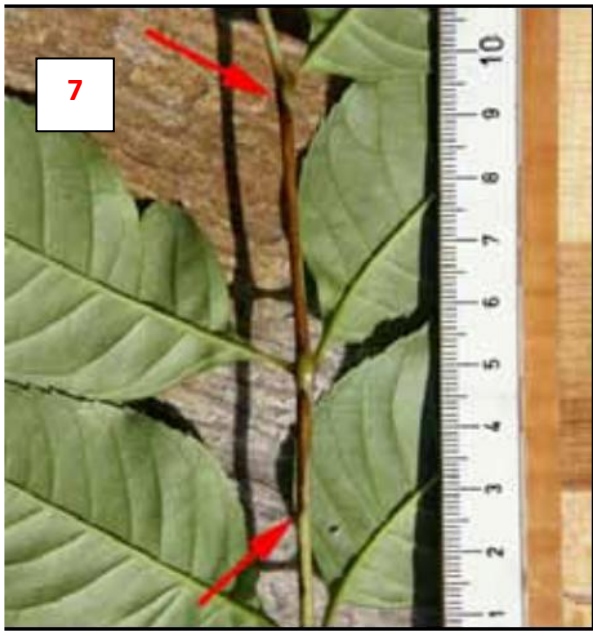


Fotografija 3 prikazuje lezije, koje prstenuju granu ili deblo te mogu uzrokovati venuće lišća iznad lezije, dok fotografija pod rednim brojem 4 prikazuje odumiranje izbojaka i grančica na periferiji krošanja. Guste grupe lišća mogu se vidjeti u podnožju grana na mjestima ispod lezija, gdje se stvaraju mnogobrojni novi izbojci.



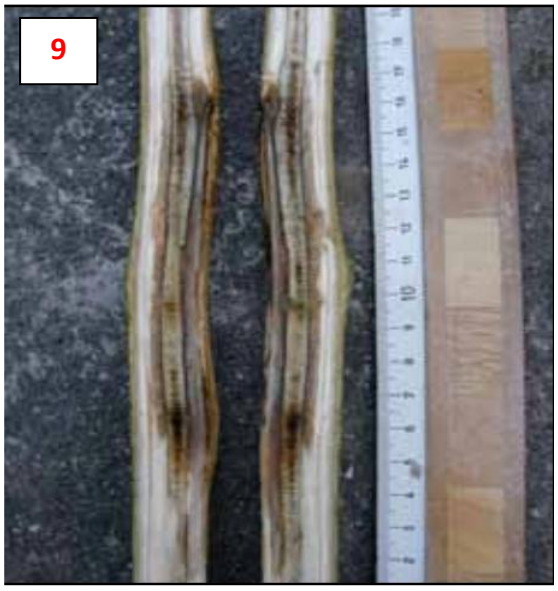
U kasno ljeto ili ranu jesen (od srpnja do kolovoza), mogu se pronaći plodna tijela *Hymenoscyphusa* na pocrnjelim peteljkama listova jasena u prostirci na vlažnim mjestima ispod jasenovih stabala. Plodna tijela ne moraju nužno pripadati patogenu ali se mogu testirati da se utvrdi njihov identitet





Fotografija 8 prikazuje nekrozu lista (a), širenje duž glavne žile liske (b) te širenje uz lisnu os ili rahis (c). Sljedeća fotografija prikazuje lezije bez simptoma na liskama.





Posljednje dvije fotografije ovog dijela rada prikazuju razoj lezija povezanih sa lisnim ožiljcima (8) te drvo i srž koji kao posljedicu napada patogena pokazuju jaku diskoloriranost (obojenost).

(http://www.forestry.gov.uk/pdf/Symptoms_guide_Chalara_dieback_of_ash_2012.pdf/$FILE/Symptoms_guide_Chalara_dieback_of_ash_2012.pdf) Autori fotografija: 1 i 2 Iben Margrete; 3,6,7,8 i 9 T. Kirstis; 5 Lea Vig McKinney

6. BOLEST PROPADANJA (ODUMIRANJA) JASENA U HRVATSKOJ

Prva odumiranja stabala jasena uočena su i potvrđena 2009. godine na području Gorskog kotara, točnije gospodarske jedinice Belavine, Zalesina. Uzorci uzeti sa navedene lokacije obrađivani su na Zavodu za zaštitu šuma i lovno gospodarenje, odnosno u Laboratoriju za patologiju drvećaŠumarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

U listopadu 2010. istraživanja su proširena na područja Šumarije Vrbovsko, Ravna Gora, Delnice i Mrkopalj dok je 2011. uzorkovanje i praćenje stabala jasenovih sastojina prošireno i na područje sjeverne Hrvatske, s ciljem utvrđivanja prisutnosti patogena i odumiranja te propadanja jasenovih stabala. Uz obični jasen, uzorkovane

su i simptomatične grane poljskog jasena, radi utvrđivanja nove vrste patogena poljskog jasena (Barić i Diminić, 2012).

Predmet nadzora bila su stabla običnog i poljskog jasena u šumskim sastojinama privatnog i državnog vlasništva. Pregledi i uzorkovanja planirani su u periodu od svibnja do rujna 2011 godine. Nadzor je proveden u šumskim sastojinama na području sljedećih županija: Karlovačka, Koprivničko – križevačka, Krapinsko – zagorska, Ličko – senjska, Međimurska, Osječko – baranjska, Primorsko – goranska, Požeško – slavonska, Sisačko – moslovačka, Varaždinska, Vukovarsko – srijemska, Zagrebačka i Grad Zagreb (Županić et al. 2012).

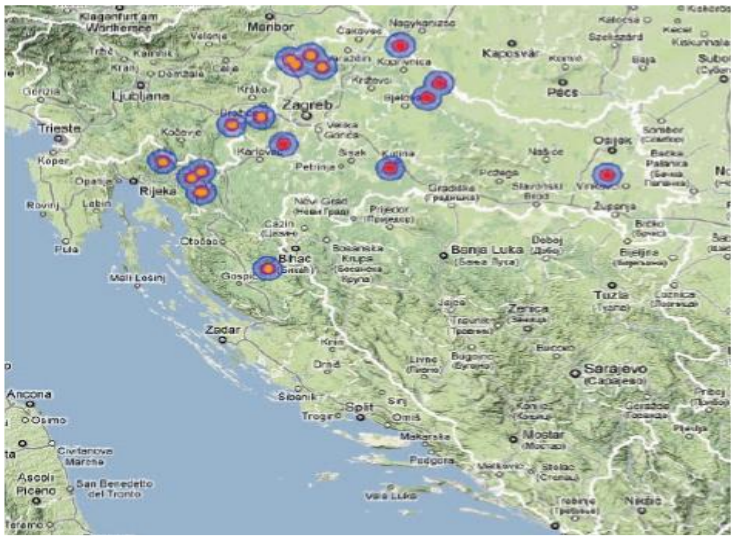
Šumarska inspekcija u suradnji s Hrvatskim šumarskim institutom pregledavala je stabla običnog i poljskog jasena u šumskim sastojinama na više različitih mjesta po lokalitetu jedanput godišnje. Vizualan pregled obavljen je tako da su prilikom obilaska terena nasumično odabirana stabla koja su detaljnije pregledavana uz pomoćoptičkih pomagala. Ako su primjećeni simptomi, obarani su dijelovi stabala ili cijela stabla te su sakupljani uzorci napadnutih izbojaka i grana (Županić et al. 2012).

Na 20 lokaliteta primjećeni su simptomi te je uzeto ukupno 27 uzoraka za laboratorijsku analizu. Simptomi su podjednako primjećivani na mladim biljkama od razvojnog stadija koljika pa do odraslih stabala. Nakon analize na 24 uzorka skupljena sa 19 lokaliteta potvrđena je prisutnost bolesti. Od toga je na 11 lokaliteta utvrđena bolest na običnom, a na 8 lokaliteta na poljskom jasenu.

Tablica 5. Lokaliteti istraživanja sa navedenim vrstama domaćina, broj obavljenih pregleda, uzetih uzoraka te pozitivnih analiza

Lokalitet, gospodarska jedinica; odsjeci *Site, management unit; forest subcompartments*	Datum pregleda *Date of inspection*	Vrsta domaćina *Tree species*	Pregledana površina (ha) *Research area (ha)*	Broj obavljenih pregleda *Number of inspections*	Broj uzetih uzoraka *Number of samples taken*	Broj pozitivnih analiza *Number of positive analyses*
Kotoriba Donje Međimurje; 69c, 70c	26. 5. 2011.	*F. angustifolia*	16	2	2	2
Vinkovci Kunjevci;	7. 6. 2011.	*F. angustifolia*	20	1	0	0
Đurđevac Đurđevačke nizinske šume; 89c	15. 6. 2011.	*F. angustifolia*	11	1	1	1
Draganić Draganički lugovi; 38a, 47a, 54a	15. 6. 2011.	*F. angustifolia*	15	3	3	0
Karlovac Zapadni Papuk zvečevački;	16. 6. 2011.	*F. excelsior*	10	1	0	0
Zagreb Sljeme – Medvedgradske šume; 8a, 18a, 18b	30. 6. 2011.	*F. excelsior*	30	1	0	0
Ivanec Ravna gora; 7g	4. 7. 2011.	*F. excelsior*	3	1	1	1
Ivanec Sjeverna Ivančica; 12c	4. 7. 2011.	*F. excelsior*	10	1	1	1
Krapina Macelj; 20a	5. 7. 2011.	*F. excelsior*	10	1	1	1
Krapina Strahinjčica – Trnovec; 1b, 1c	5. 7. 2011.	*F. excelsior*	8	1	1	1
Vrbovsko Goranska Dobra; 23a	11. 7. 2011.	*F. excelsior*	4	1	1	1

Lokalitet, gospodarska jedinica; odsjeci *Site, management unit; forest subcompartments*	Datum pregleda *Date of inspection*	Vrsta domaćina *Tree species*	Pregledana površina (ha) *Research area (ha)*	Broj obavljenih pregleda *Number of inspections*	Broj uzetih uzoraka *Number of samples taken*	Broj pozitiv analiz *Numbe positi analy*
Ravna gora Ravna gora; 41, 132, 136	11. 7. 2011.	*F. excelsior*	15	3	3	3
Delnice Brod na Kupi;	11. 7. 2011.	*F. excelsior*	3	1	0	0
Jasenak privatne šume – Vrelo;	24. 8. 2011.	*F. excelsior*	3	2	2	2
Ozalj Sušica; 20b	25. 8. 2011.	*F. excelsior*	3	1	1	1
Krašić Kupčina – Žumberak; 12a, 12d	25. 8. 2011.	*F. ornus*	10	1	0	0
Samobor Žumberak – Novoselska gora; 14b	30. 8. 2011.	*F. excelsior*	20	1	1	1
Korenica Laudonov gaj; 3b	1. 9. 2011.	*F. excelsior*	13	1	1	1
Osijek Osječke nizinske šume; 35a	7. 9. 2011.	*F. angustifolia*	20	1	1	1
Sunja Lonja; 61a	9. 9. 2011.	*F. angustifolia*	8	1	1	1
Đurdevac Đurdevačka Bilogora; 44d	13. 9. 2011.	*F. angustifolia*	2	1	1	1
Pisarovina Pisarovinski lugovi; 6a	14. 9. 2011.	*F. angustifolia*	30	1	1	1



Slika 10. Žarište i demarkacijske zone zarazom gljive *Hymenoscyphus fraxineus* u Hrvatskoj

7. MATERIJALI I METODE

7.1. PROCJENA VITALNOSTI I OŠTEĆENOSTI STABALA

Lokacije korištene za uzorkovanje stabala običnog jasena (*F. excelsior*) izabrane su na temelju referencije s terena o propadanju i odmiranju stabala jasena. Dolaskom na spomenute lokacije prvo je bilo potrebno procjeniti vitalnost i oštećenost stabala. Propadanje stabala, u šumarstvu se procjenjuje na temelju vanjskog izgleda stabala, odnosno na temelju procjene oštećenosti stabala. Oštećenost stabala obuhvaća oštećenost krošnje, debla i korjena. Oštećenost krošnje utvrđuje se na temelju osutosti i promjene boje krošnje. Kod procjene osutosti krošnje procjenjuje se postotak osutosti lišća u odnosu na normalno razvijenu krošnju iste vrste drveća. Konačna faza propadanja je odumrlo drvo kod kojeg je nastupio potpuni prestanak svih fizioloških funkcija. Također, kada govorimo o intenzitetu odumiranja stabala tada njega utvrđujemo na temelju broja stabala, drvne mase ili smanjena prirasta sastojina. Razlikujemo mali, srednji, veliki i katastrofalan intenzitet odumiranja stabala.

Vitalnost stabala definirana je kao životna snaga stabla za obavljanje svih životnih funkcija. Kriteriji i indikatori koje koristimo da bismo mogli utvrditi vitalnost stabla pojedine vrste drveća su: oštećenost krošnje, oštećenost grana, odumrle grane, oblik krošnje, osutost krošnje, promjena boje krošnje, gustoća krošnje, prozirnost krošnje, bujnost krošnje, progale u krošnji, pravilnost krošnje i prorjeđenost krošnje. Procjena vitalnosti stabala se vrši na temelju hijerarhijske metode procjenom najmanje tri indikatora vitalnosti stabala prema onom redosljedu kojim se najbolje uočava određeni kriterij.

Vizualnim pregledom stabala također moramo utvrditi postoji li simptoma koji bi upućivali na patogena koji se smatra uzrokom neke od navedenih pojava. Tako smo dolaskom na dojavljene lokacije pokušali pronaći tipične simptome koji bi upućivali da se upravo radi o bolesti odumiranja jasenovih stabala, odnosno njenom uzročniku *Hymenoscyphus fraxineus.* Dakle, simptome koje smo tražili, navedni u poglavlju 4.4 su nekrotične lezijesmečkasto crne boje na peteljkama lista te na samom listu, također smeđe nekrotične lezije na kori izbojka. Zatim vizualnim pregledom krošnje moguće je pretpostaviti kako se radi o napadu patogena *H. fraxineus*. Takve krošnje

su kako je već navedeno karakteristično neurednog izgleda zbog novih izbojaka koje zaraženo stablo potjera.



Slika 11. Simptomi *H. fraxineus*

(www.alamy.com; commons.wikimedia.org)

Nakon što smo navedenim postupcima potvrdili sumnju na prisutnost patogena krećemo s postupkom uzorkovanja.

7.2. UZORKOVANJE

Postupak uzorkovanja razlikuje se s obzirom na biljni materijal koji uzorkujemo. Ukoliko su na lezijama vidljiva plodna tijela tada te biljne dijelove prikupljamo, isto tako ukoliko su na lisnom materijalu (lišće i lisne peteljke) vidljivi simptomi patogena kojeg uzorkujemo, tada uzorkujemo te biljne dijelove sa zaražene biljke, neovisno o dobi iste. Kod mladih i zrelih jedinki uzima se uzorak izbojka na kojem je vidljiva karakteristična rak rana, a koji mora biti duljine između 10 i 20 cm. Uzorak se uzima na prijelazu zdravog i zaraženog dijela izbojka. Kod odraslih stabala moguća su dva načina prikupljanja uzoraka. Prvi način izvodi se tako da se ukloni kora s dijela na kojem se vidi karakteristična nekroza te se uzima uzorak drva, također na prijelazu zdravog u diskolorirani diotkiva. Drugi način koji je moguće koristiti, a pogodniji je ukoliko se radi o jako zaraženom stablu (pred završnom fazom odumiranja stabla) je

obaranje stabla te uzimanje poprečnog presjeka debla (kolut) po mogućnosti na prijelazu zdravog i inficiranogdijela debla, no kako se često radi o u cjelosti zaraženom deblu, uzimamo uzorak po vlastitoj procjeni (pratimo pojavu diskoloracije u unutrašnjosti debla).

Ukoliko se želi utvrditi samo prisutnost patogena u sastojini potrebno je uzorkovati peteljke jasena u listincu te odnijeti na analizu.

Nakon što uzorkujemo izbojke na kojima smo uočili simptome koji odgovaraju patogenu kojeg istražujemo, iste moramo pohraniti u plastične ili kartonske vrećice koje na odgovarajući način moramo zatvoriti. Uzorke pohranjujemo u plastične vrećice kako nebi došlo do njihovog isušivanja odnosno gubitka vlage te kako uzorci nebi bili kontaminirani nekim patogenom koji nas može ometati tijekom daljnjih analiza. Tako pohranjene uzorke spremamo na tamno mjesto odnosno na mjesto gdje uzorci neće biti na direktnom utjecaju sunčeve svjetlosti. Dolaskom u laboratorijske prostore uzorke pohranjujemo na temperaturu od 2 – 8 °C. Ukoliko planiramo raditi izolaciju patogena tada uzorci na navedeni način mogu stajati 24 – 48 sati, a za molekularne analize i nekoliko dana. Neki autori navode kako uzorci za molekularne analize mogu biti i zaleđeni određeno vrijeme. Za potrebe izrade ovog diplomskog rada korišteni su uzorci izbojaka i tanjih grana običnog jasena (*F. excelsior*) duljine 10 – 20 centimetara.

7.2.1. Priprema umjetnih hranjivih podloga

Prilikom laboratorijskog dijela izvedbe ovog diplomskog rada osnovu za analizu uzoraka uzetih sa različitih lokacija činile su hranjive podloge, čiju ću pripremu opisati u nastavku. Za uzgoj i identifikaciju gljive koristio sam dva tipa agara: MEA (Malt extract agar) koji služi za uzgoj, izolaciju te uzgojkvasaca i plijesni u kliničkim uzorcima, ali ima i široku uporabu u okolišnim izvorima, također, korišten je i PDA (Potato dextrose agar) koji se primjenjuje u mikologiji za selektivan uzgoj gljiva iz različitih (mješanih) uzoraka.

Za pripremu hranjivih podloga korištena je: vaga, Erlenmeyerova tikvica od 1000 ml, kuhalo za vodu, autoklav, žlica,agar, antibiotik (streptomicin) te na kraju petrijeve zdjelice.

Svaki od navedenih agara u svojim uputama za uporabu ima navedenu količinu agara potrebnog za proizvodnju 1000 ml hranjive podloge. Tako kod MEA (Malt extract agar) to iznosi 50 g/l, a kod PDA (Potato dextrose agar) to iznosi 39 g/l. Cjelokupan navedni pribor mora biti steriliziran i u potpunosti čist. Na laboratorijskoj vagi odmjerimo potrebnu količinu agara. U Erlenmeyerovu tikvicu nalijemo 1000 ml destilirane vode te istu stavimo na grijalo. Destiliranoj vodi dodajemo odvaganu količinu agara te uz pomoć magnetnog štapića postignemo mješanje suspenzije. Temperatura električne mješalicemora biti 250°C, a broj okretaja 750 u minuti. Nakon što suspenzija agara i destilirane vode postane homogena te uočimo ključanje otopine istu zaštitnim rukavicama sklanjamo s kuhala te otopinu razlijevamo u dvije bočice po 500 ml. Navedene bočice moraju biti otporne na visoke temperature. Nakon što smo otopine razlili počinjemo sa postupkom sterilizacije iste. Bočice stavljamo u autoklav i steriliziramo10 minuta na 115°C za Malt extract agar odnosno 15 minuta na 121° C za Potato dextrose agar. Dok čekamo navedenu sterilizaciju, u besprašnoj komori pripremimo petrijeve zdjelice koje ćemo koristiti kao posude za analizu uzoraka. Petrijeve zdjelice također dodatno steriliziramo pod UVC svjetlom. Nakon što je sterilizacija završena, pričekamo da se tlak i temperatura autoklava spuste kako bi sigurno rukovali potrebnom aparaturom. Bočice sa steriliziranom hranjivom podlogom izvadimo iz autoklava, pričekamo da se ohlade na temperaturu od oko 60°C (dovoljno da sigurno možemo rukovati istom). Nakon što je temperatura hranjive podloge došla do povoljne razine i ona postane sigurna za rukovanje , počinjemo sa razlijevanjem u prethodno pripremljene petrijeve zdjelice. Završetkom razlijevanja dobili smo hranjive podloge, nakon hlađenja spremne za korištenje za daljnju izvedbu ovog rada. Petrijeve zdjelice sa hranjivom podlogom zatvorimo, označimo vrstom korištenog agara, datumom proizvodnje, eventualnim dodacima te osobom koja je odradila prethodno opisani postupak. Hranjive podloge se skladište u sterilne vrećice na čisto, tamno i sterilno mjesto.

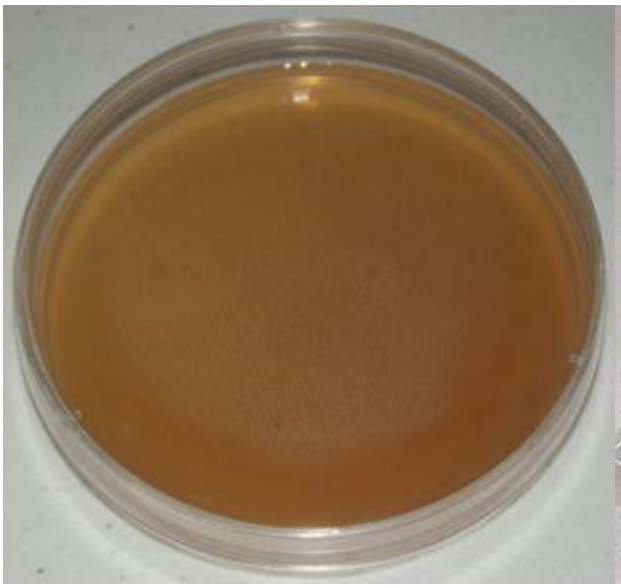
Preporučljivo je izolaciju gljive *Hymenoscyphus fraxineus* izvoditi uz dodatak antibiotika (Kowalski, 2006). Ukoliko agaru odnosno mediju dodajemo antibiotik tada se isti mora ohladiti na 45°- 52° C. Nakon što smo dostigli željenu temperaturu

dodajemo Streptomicin sulfat (100 mg/L) te nakon što se agar ohladi, pohranjujemo ga na 2 – 8 °C, najviše mjesec dana.



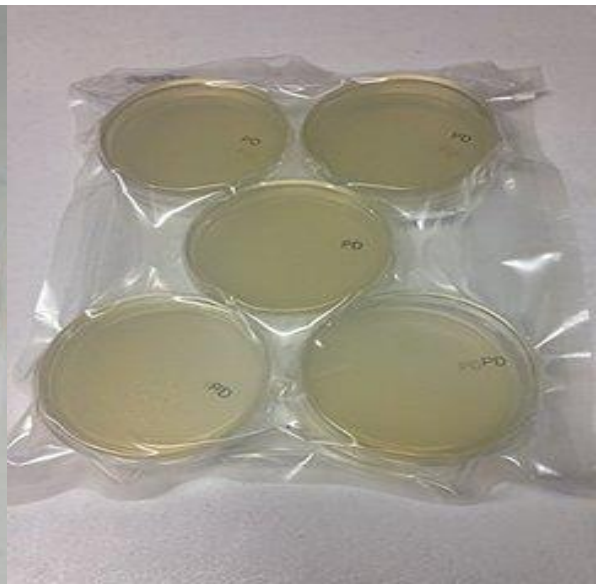
Slika 12. Malt ekstrakt agar i potato dextrose agar

(http://www.southernbiological.com/)(www.titanbiotechltd.co.in)



Slika 13. Sterilizirani Malt ekstrakt agar

(www.popscreen.com)



Slika 14. Sterilizirani Potato dextrose agar

(www.amazon.com)

7.3. OZNAČAVANJE UZORAKA

Svi uzorci uzeti na prethodno opisane načine moraju biti pravilno označeni ili etiketirani. Kod označavanja uzoraka vrlo je bitno navesti biljnu vrstu (latinsko ime vrste i narodni naziv) koju smo uzorkovali, datum uzorkovanja i lokaciju. Iste radnje ponavljamo za sve uzorke uzete na različitim lokacijama ili različitih datuma. Ukoliko radimo usporedbu nekoliko stabala na istoj lokaciji i uzorkujemo svako stablo pojedinačno, tada moramo svako stablo imenovati ili na neki od uzorkivaču poznatih načina označiti o kojoj se jedinki radi (npr. H1, H2, H3, ...). Osim podataka koje sam naveo, može se naznačiti i vrijeme kada je uzorak uzet, ime uzorkovača i eventualnu bilješku koja bi bila od značaja osoblju koje će provoditi analize.



Slika 15. Uzorci običnog jasena u plastičnim vrećicama

(Milotić, 2015)

Prije same izolacije patogena koju smo provodili u Laboratoriju za patologiju drveća Šumarskog fakulteta bilo je potrebno u sterilnim uvjetima pregledati prikupljene uzorke te napravili selekciju onih koji nam odgovaraju za daljnje istraživnje i analize. To su uzorci koji svojom debljinom odgovaraju korištenju za daljnje postupke(izbojak mora biti dovoljnog promjera da ne dođe do njegovog pucanja prilikom uzorkovanja), uzorci koji imaju jasno vidljive simptome napada patogena (nekrotične lezije), ali s dovoljno zdravog dijela biljnog tkiva te uzorci koji su zadržali dovoljno vlažnosti.



Slika 16. Selekcija i tipiziranje uzoraka u Laboratoriju Šumarskog fakulteta

(Milotić, 2015)

Poslije postupka selekcije uzoraka, nastupa njihovo čišćenje vidljivih nečistoća, eventualnih zaostalih dijelova lista, uklanjanje insekata ukoliko uočimo njihovo prisustvo te skračivanje uzoraka ukoliko smo uzeli predugačke kako bismo mogli istima lakše rukovati.

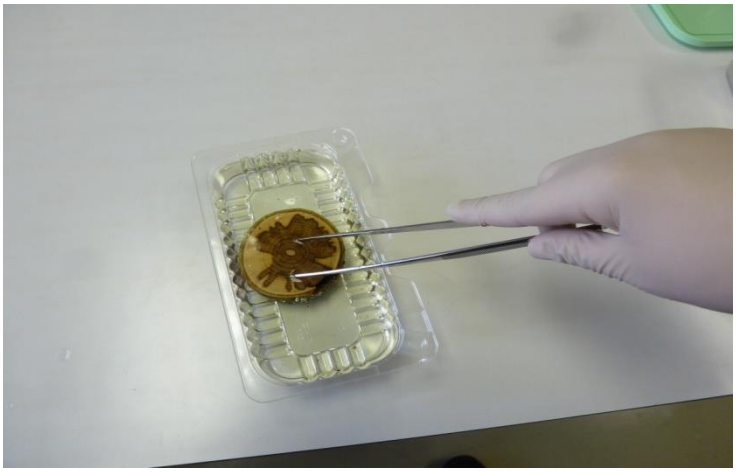
Potrebno je napomenuti kako sve pripreme biljnog materijala i izvođenje laboratorijskih analiza moraju biti u strogo sterilnim uvjetima što uključuje zaštitu laboratorijskog djelatnika zaštitnim odjelom (kuta), laboratorijska maska za usta, rukavice (sterilne ili jednokratne) te zaštitne naočale.

7.4. POVRŠINSKA STERILIZACIJA UZORAKA

Na površini uzetih uzoraka, zbog svježine istih, nalazi se veliki broj aktivnih patogena i kontaminanata koji mogu dovesti do kontaminacije ostalog biljnog materijala koji smo uzorkovali ili pak laboratorijskog prostora u cjelini. Kako bismo spriječili navedenu situaciju izvodimo površinsku sterilizaciju uzetog materijala.

Postupak površinske sterilizacije je slijedeći:

1.) Uzorkovani materijal prvo ispiremo i detaljno čistimo sa 70% etanolom u trajanju o cca. 1 minute. Ukoliko vidimo da nam uzorak nije dovoljno čist možemo uz pomoć pincete i malo vate (vatu obavezno fiksirati što je više moguće kako nebi došlo do zaostajanja njenih dijelova na uzorku) pokušati očistiti područje za koje smatramo da nije dovoljno čisto.
2.) U drugom dijelu ovog procesa uzorak steriliziramo u 4% HCl – u isto cca 1 minutu.



Slika 17. Površinska sterilizacija uzorka u 90% etanolu

(Milotić, 2015)

Vrijeme sterilizacije možemo prilagođavati i korigirati ovisno o veličini i debljini samog materijala koji steriliziramo. Za površinsku sterilizaciju možemo koristiti i površinsko spaljivanje (Jankovsky i Holdenrierder, 2009)

Istekom 1 minute i završetkom drugog dijela površinske sterilizacije, sterilizirani uzorak odlažemo na sterilni upijajući materijal, najčešće je to filter papir koji postavljamo u laminarij. Tako pripremljen materijal prenosimo na sušenje u besprašnu komoru kojom preveniramo ponovnu kontaminaciju steriliziranog materijala.



Slika 18. Sušenje uzoraka običnog jasena (*F. excelsior*) u besprašnoj komori (Milotić, 2015)

7.5. IZOLACIJA PATOGENA

Za izolaciju patogena najbolje je koristiti biljne dijelove u kojima je patogen aktivan, jer nekrotizirana kora predstavlja idealan medij na nastanjivanje brojnih mikroorganizama koji bi nakon izvedenog postupka izolacije potisnule rast gljive *Hymenoscyphus fraxineus*, a koja je osnova za izvedbu ovog diplomskog rada.

Kako sam za izvedbu ovog rada koristio izbojke s vidljivim simptomima, koristio sam način opisan u nastavku. Za izolaciju patogena ne koristimo koru, te se ona skalpelom uklanja sa materijala koji koristimo za izolaciju. Cijeli postupak izvodi se u besprašnoj komori u sterilnim uvjetima. Uklanjanjem kore, krećemo uzimati uzorke za izolaciju. Skalpelom uzimamo komadiće drva (tkiva) veličine 5x2x2 mm, koji sadrže dijelove drva, floema i kambija. Dobro je uzimati uzorke na prijelazu zdravog i bolesnog dijela izbojka (uz rub nekroze odnosno diskoloracije) iz razloga što se smatra da je u tom području patogen najaktivniji.



Slika 19. Izolacija patogena, nanošenjem uzoraka na umjetnu hranjivu podlogu

(Milotić, 2015)

Tako uzete uzorke nasađujemo u prethodno pripremljene jednokratne petrijeve zdjelice (d = 90 mm) s 2% agara krumpirove dekstoze uz prethodno dodan streptomicin sulfat (100 mg/L) kako bismo spriječili razvoj bakterija na samoj umjetnoj podlozi s obzirom na to da je poznato kako *H. fraxineus* ima vrlo spor intenzitet rasta.Kao ubrzivač rasta micelija gljive može se koristiti i dodatak ekstrakta lišća običnog jasena(100 g/L). Navedeni ekstraktdodaje se prije autoklaviranja kako bi ekstrakt ostao u sterilnom agaru. Nakon autoklaviranja, a prije razlijevanja agara dijelovi listova se uklanjaju. Kowalski u svojim objašnjenjima ovog postupka navodi kako za postupak izolacije patogena koristi Malt extract agar (MEA) s dodatkom antibiotika.

Nakon što smo odradili postupak izolacije, petrijeve zdjelice zatvaramo te ih obilježavamo podacima o porijeklu biljnog materijala kojeg smo prethodno nasadili. Petrijeve zdjelice pohranjujemo u termo komoru, te izolate uzgajamo 2 – 3 tjedna na 20 – 22 °C. Kako sam već napomenuo intenzitet rasta je vrlo nizak te u prosjeku iznosi između 0,3 i 1,7 mm dnevno (Hauptman i sur., 2013).



Slika 20. Pojava micelija Chalara fraxinea – e nakon 2 – 3 tjedna

(Milotić, 2015)

Nakon 2 – 3 tjedna, ukoliko se radi o *H. fraxineus* vidjeti ćemo tipične pamučno bijele i svjetlonarančaste kolonije koje ova gljiva tvori, a koje su gotovo uvijek kreću od tamnije prema svjetlosmeđoj boji, a ponekad i tamnozelenoj.

Za izolaciju patogena i dobivanje čistih kultura, nasađene uzorke moramo svakodnevno provjeravati te kada su kulture micelija dovoljno velike da ih možemo morfološki raspoznati, micelij morfološki karakteriziramo pomoću svjetlosnog mikroskopa.

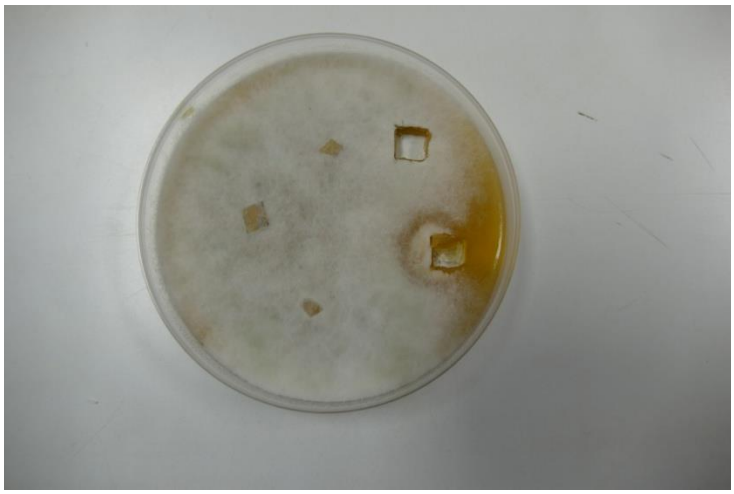
Kada svjetlosnim mikroskopom utvdimo prisutnost patogena, u besprašnoj komori krećemo sa presađivanjem dijelova micelija gljive *C. fraxinea.* Kao umjetnu hranjivu podlogu u nastavku istraživanja korišten je Malt extract agar (MEA), pripremljen također u jednokratnim petrijevim zdjelicama (d = 90 mm).

Pribor potreban za presadnju patogena i dobivanje čistih kultura je:

1.) Plinski plamenik
2.) Laboratorijska eza
3.) Etanol 90%
4.) Jednokratne petrijeve zdjelice (d = 90 mm) sa MEA agarom
5.) Etikete za označavanje presađenih uzoraka

Cjelokupni navedeni materijal mora biti u potpunosti sterilan.

Uzimamo izolirane uzorke u kojima smo morfološki utvrdili prisutnost patogena, laboratorijsku ezu dezinficiramo u 90% etalnolu te pod plamenom i odvajamo kvadratić veličine cca 5 x 5 milimetara. Preporučljivo je navedeni kvadratić uzeti na rubnim dijelovima micelija, upravo iz razloga jer je aktivnost patogena na tom području najveća. Pažljivo prenosimo uzeti uzorak i gornjom stranom, okrenutom prema dolje nanosimo na novopripremljene petrijeve zdjelice sa MEA agarom.



Slika 21. Primjer presadnje patogena za dobivanje čistih kultura

(Milotić, 2015)

Dva do tri tjedna od presadnje došlo je do razvoja micelija u dovoljnoj veličini da bismo ga mogli koristiti za daljnje istraživanje. Za svaku pojedinu lokaciju presađujemo po 10 izolata, označavamo lokacijom uzorka i datumom presadnje. Svaku petrijevu zdjelicu zatvaramo parafinskom naljepnicom kako se presađeni uzorci nebi isušili ili kontaminirali.

7.6. APLIKACIJA ULTRAVIOLENTNOG SPEKTRA SVJETLOSTI

Presađene uzorke pohranili smo u termo komoru na temperaturu od 20 do 22 °C, pod utjecajem različitih ultraviolentnih zraka svjetlosti (svjetlosti vidljivog spektra, UVA te UVB).

Pod svjetlosti vidljivog spektra smatraju se sve svjetlosti s valnom duljinom u rasponu od 390 do 750 nm.

Ultraljubičasta svjetlost obuhvaća elektromagnetsko zračenje u valnim duljinama manjim od onih koje ima vidljiva svjetlost, ali većim od onih koje imaju meke X zrake. Ultraljubičasta svjetlost (UV) se dijeli na UVA (400 – 315 nm) ili dugovalno, tamnije, crno svjetlo, UVB (315 – 280 nm) ili srednjevalno svjetlo, te UVC (<280) kratkovalno ili antimikrobno svjetlo.

Uzorci su postavljeni pod utjecajem UV zraka svjetlosti u pravilnim vremenskim periodima 12:12 što znači da je izloženost izolata u petrijevkama ultravioletnim zrakama bila 12 h dnevno dok je preostalih 12 sati dnevno komora je bila u mraku na stalnoj temperaturi od 20° C. Lampe korištene za provođenje ovog postupka su marke Osram i Phillips jakosti 9 W. Period rasta praćen je i mjeren svakih 3,5 dana pri čemu su se izolati vadili iz komore i vršilo se mjerenje rasta micelija gljive. Nakon obavljenog postupka mjerenja, izolati su se vraćali odmah u komoru natrag kako nebi došlo do narušavanja procesa postupka pokusa ili vanjskih svjetlosnih utjecaja na rezultate pokusa.

7.7. PODRUČJE RADA

Prikupljanje uzoraka za istraživanje provedeno i opisano ovim radom započelo je 1. rujna i trajalo je do 31. listopada 2015 godine. Lokacije na kojima su uzorci prikupljeni u Hrvatskoj su: 1.) Brinje

2.) Čazma

3.) Ivanščica

4.) Nova Gradiška

5.) Zalesina

Isto tako, korišteni su i uzorci s lokacija na području Kraljevine Belgije, a koje sam također koristio u ovom diplomskom radu.

Spomenute lokacije su: 1.) Solumes

2.) Nafraiture

3.) Gembloux

4.) Chevetogne

5.) Heer

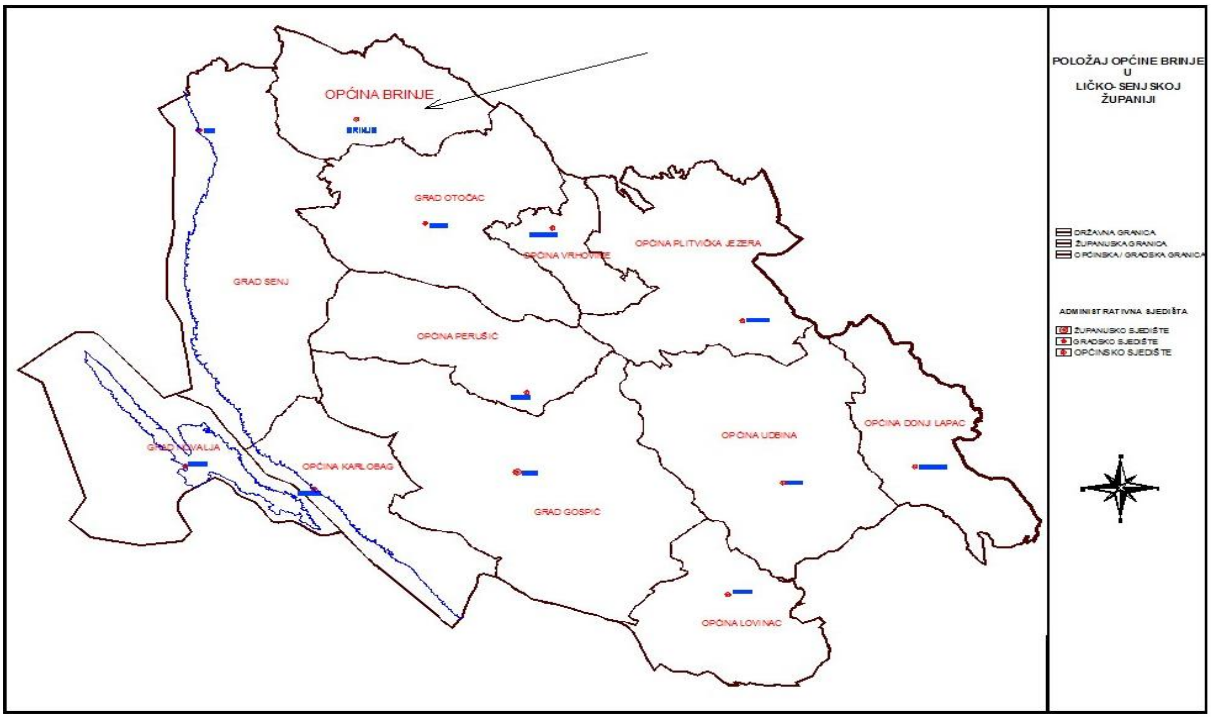
Brinje

Brinje je naselje u sjeverozapadnom dijelu Like te općina u Ličko – senjskoj županiji, smještena u Brinjskom krškom polju u sjevernozapadnom dijelu Gackog polja u brinjskoj zavali, na trasi Jozefinske ceste te uz današnju autocestu Zagreb – Split. Brine je sjedište općine koja se prostire između obronaka Velike Kapele i Velebita.

Područje brinjskog kraja zemljopisno se naslanja na Primorje, ali bez obzira na to klima je izrazito kontinentalna te je zbog temperaturnih inverzija ovo jedan od najhladnijih krajeva u Hrvatskoj, gdje su ljeta kratka i sušna, a zime duge i snježne.

Šume i šumske površine na području Ličko – senjske županije zauzimaju 327.188,69 ha po podacima Hrvatskih šuma, prema podacima prostorno planske dokumentacije to je 415.896,08 ha. Gospodarske šume nalaze se na 84,49% površine, 3,02 su zaštitne šume, a 9,49 su šume posebne namjene.

U gospodarskim šumama su zastupljene zajednice jele i bukve s primjesima običnog ili bijelog jasena, graba, hrasta kitnjaka, smreke i sl.



Slika 22. Geografski položaj Općine Brinje

(www.brinje.hr)

Čazma

Grad Čazma nalazi se u sjeverozapadnom dijelu Hrvatske u Bjelovarsko – bilogorskoj županiji. Udaljen je svega 60 km od Zagreba i 30-tak kilometara od središta regije. U njemu na 238 četvornih kilometara živi oko 9000 stanovnika, većina u 36 prigradskih naselja. Od šumskih vrsta drveća na ovom području pridolaze hrast lužnjak, poljski jasen, obični jasen, hrast kitnjak, bukva, topola i obični bagrem.

Ivanščica

Ivanščica je najviša planina sjeverozapadne hrvatske, smještena u Hrvatskom Zagorju. Proteže se u smjeru zapad – istok, duga je oko 30 km i široka do 9 km, a omeđena je vodotocima Bednje, gornjeg toka Lonje, Krapine i Velikog potoka.

Od šumskih zajednica koje pridolaze na području Ivanščice nalazimo zajednice hrasta kitnjaka i običnoga graba, hrasta lužnjaka i lipe, pitomog kestena, crne johe itd.



Slika 23. Geografski položaj Ivanščice

(www.schnee-hr.com)

Nova Gradiška

Nova Gradiška je smještena u jugozapadnom dijelu istočne Hrvatske, drugi je grad po veličini u Brodsko – posavskoj županiji, a nalazi se uz vrlo važne prometnice te regije: autoceste Zagreb – Slavonski Brod – Beograd, željeznička pruga Zagreb – Vinkovci te kroz grad prolaze glavne državne ceste prema Požegi i Našicama.

Novogradški kraj je pod utjecajem umjerene kontinentalne klime, koja je značajno modificirana utjecajima gorskog masiva Psunja. Prosječne su temperature zraka razmjerno ugodne, srednja godišnja temperatura iznosi između 10,5 i 11 °C. Vrlo važno za spomenuti kada govorimo o ovom području je česta pojava temperaturnih ekstrema i zaista velike temperaturne amplitude koja se nekih godina popne i do 60 stupnjeva. U takvim uvjetima, ipak kontinentalnim vegetacijsko razdoblje traje od druge polovice ožujka do prve polovice studenoga, te uz razmjerno povoljan raspored padalina omogućava uzgoj velikog broja ratarskih i voćarskih kultura.

Ovdje prosječno godišnje padne između 813 i 820 milimetara padalina, a dakako da ima i odstupanja od navedenih vrijednosti. Okolni gorski masivi značajno modificiraju klimu ovog područja, a osobito količinu padalina, jer masiv Psunja kolokvijalno rečeno zaustavlja oblake i prima više kiše i snijega. Na Psunju prosječno padne oko 1200 milimetara kiše.



Slika 24. Geografski položaj grada Nova Gradiška

Zalesina

Zalesina je mjesto koje po teritorijalnom ustroju pripada gradu Delnicama, te se nalazi u Primorsko - goranskoj županiji. U samom mjestu smješten je i nastavno pokusni šumski objekt „Zalesina“ Šumarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Na području Zalesine izvodi se terenska nastava iz mnogih kolegija Šumarskog fakulteta. Područje Zalesine, kojim upravlja Šumarski fakultet podjeljeno je na nekoliko odjela i odsjeka.



Slika 25. Satelitski snimak geografskog položaja Zalesine

(https://www.google.hr/maps/@45.3840053)

Kada govorimo o šumskoj vegetaciji ovog područja ista je znanstveno podjeljena na način:

- razred : *Vaccinio – Piceetea* (borove – crnogorične šume)
- red: *Vaccinio – Piceetalia* (Eurosibirske acidofilne šume obične smreke, jele i bora krivulja)
- sveza: *Vaccinio – Piceion*(acidofilne smrekove i jelove šume montanskih i submontanskih položaja)
- podsveza: *Abieti – Piceenion* (acidofilne jelove šume)
- asocijacija: *Blechno – Abietetum* (jelova šuma sa rebračom)
- subasocijacija: okrugolisna broćika (*Galietosum rotundifoliae)*

Stanište na kojem pridolazi spomenuta asocijacija jelove šume s rebračom karakteriziraju manji vodotoci, a čija je prisutnost očigledna na području Zalesine.

Kada govorimo o vegetaciji ovog područja tada valja spomenuti kako je ovdje obična jela editifikatorska vrsta uz kojeg dolazi smreka, jarebika, gorski jasen te obična bukva, smanjene vitalnosti.

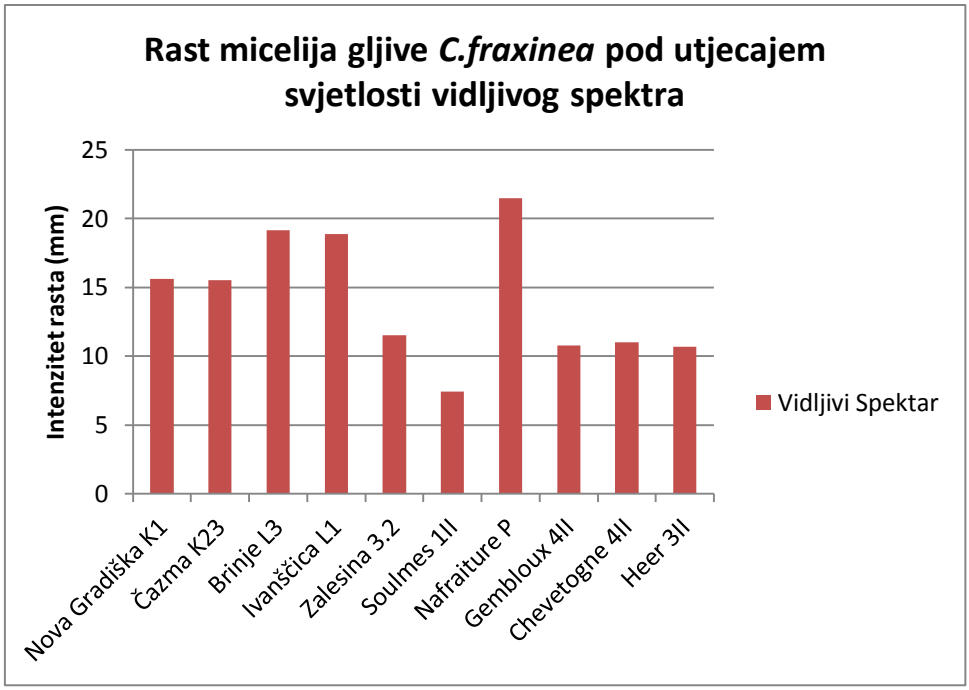
S obzirom na tematiku ovog rada, važno je spomenuti da je navedeno područje opisano kao prvo nalazište patogena *Hymenoscyphus fraxineus* u Hrvatskoj (Barić i Diminić, 2010).

8. REZULTATI

Svaki izolat bio je pohranjen u termo komori pod utjecajem različitih jačina svjetlosti (vidljivi spektar, UVA, te UVB) 3 tjedna tijekom kojih su mjerenja rasta micelija izvođena 2 puta tjedno, a dobiveni rezultati upisivani su u tablice tako da se upisuje intenzitet rasta u smjeru lijevo, desno, gore i dolje.

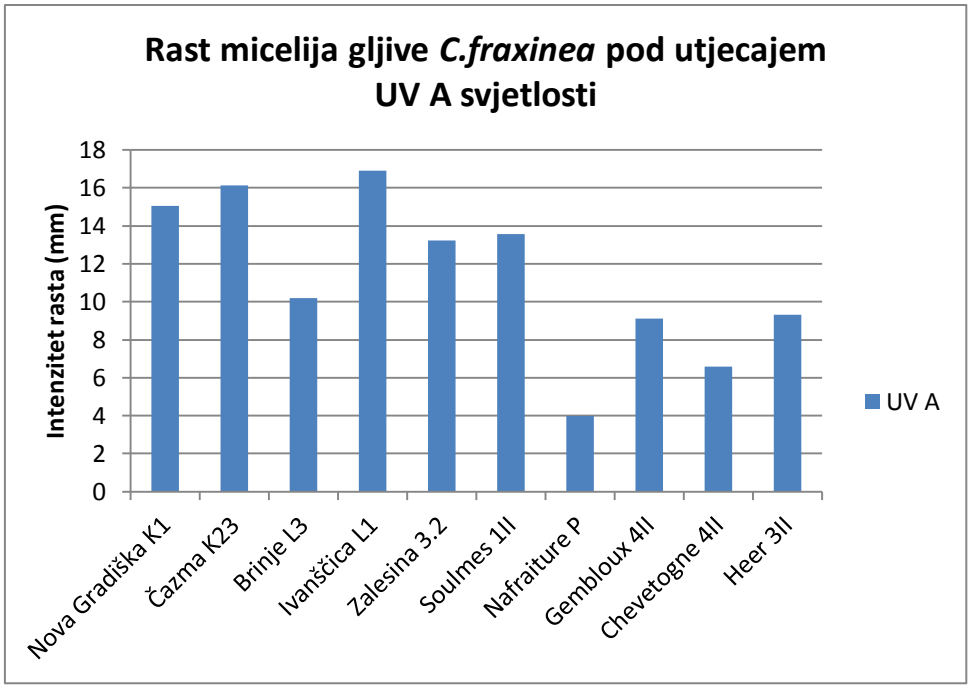
Tablica 6. Primjer praćenja rasta micelija gljive *C. fraxinea* tijekom 3 tjedna

CROATIA LOCATION 1						
20 °C	PETRY 1	NOVA GRADIŠKA K1				
	DATE	RIGHT mm	LEFT mm	UP mm	DOWN mm	AVERAGE
1	24.5.2016	4	2	2	3	2,75
2	27.5.2016	7	6	7	7	6,25
3	31.5.2016	10	12	11	10	10,75
4	3.6.2016	15	17	16	18	16,5
5	7.6.2016	16	19	17	20	18
6	10.6.2016	17	20	18	22	19,25
7						
8						
9						
10						



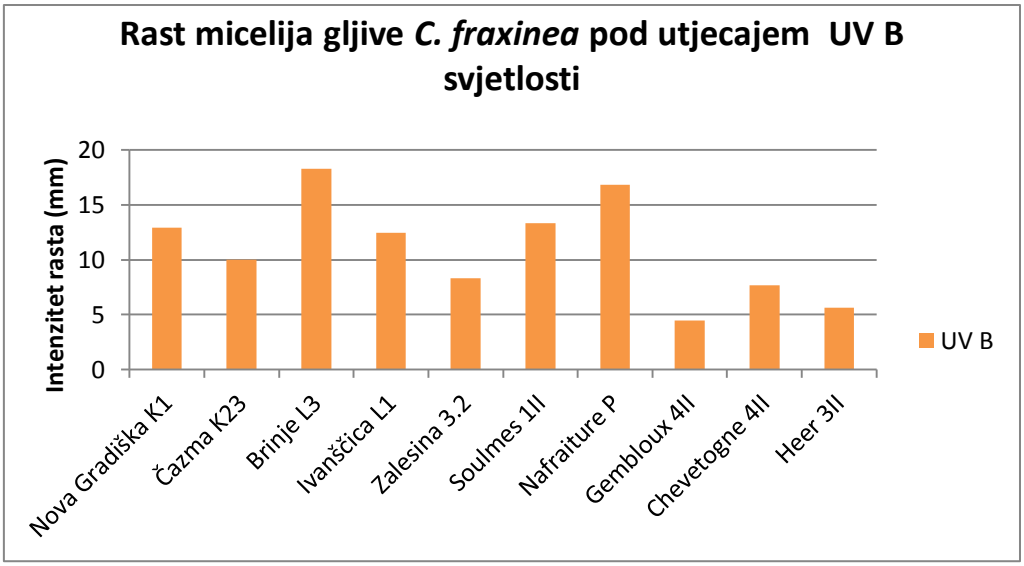
Grafikon 1. Intenzitet rasta micelija gljive *C.fraxinea* na umjetnoj hranjivoj podlozi, pod utjecajem svjetlosti vidljivog spektra

Izolati pod utjecajem svjetlosti vidljivog spektra pokazuju rast micelija u prosjeku oko 12 mm, dok najveći intenzitet rasta pokazuje izolat s lokacije Nafraiture P, a najmanji Soulmes 1 II. Zanimljivo je za primjetiti kako izolati gljive *C. fraxinea* s porijeklom iz Hrvatske imaju gotovo podjednak intenzitet rasta što ukazuje na vjerojatnu uniformnost patogena koji pridolazi na ovom području, kao i na činjenicu da svjetlost vidljivog spektra djelovanja ima znatan utjecaj u širenju ovog patogena. Jači rast izolata porijeklom iz Hrvatske, teoretski može značiti i veću agresivnost patogena na terenu u odnosu na izolate porijeklom iz Belgije (grafikon 1).



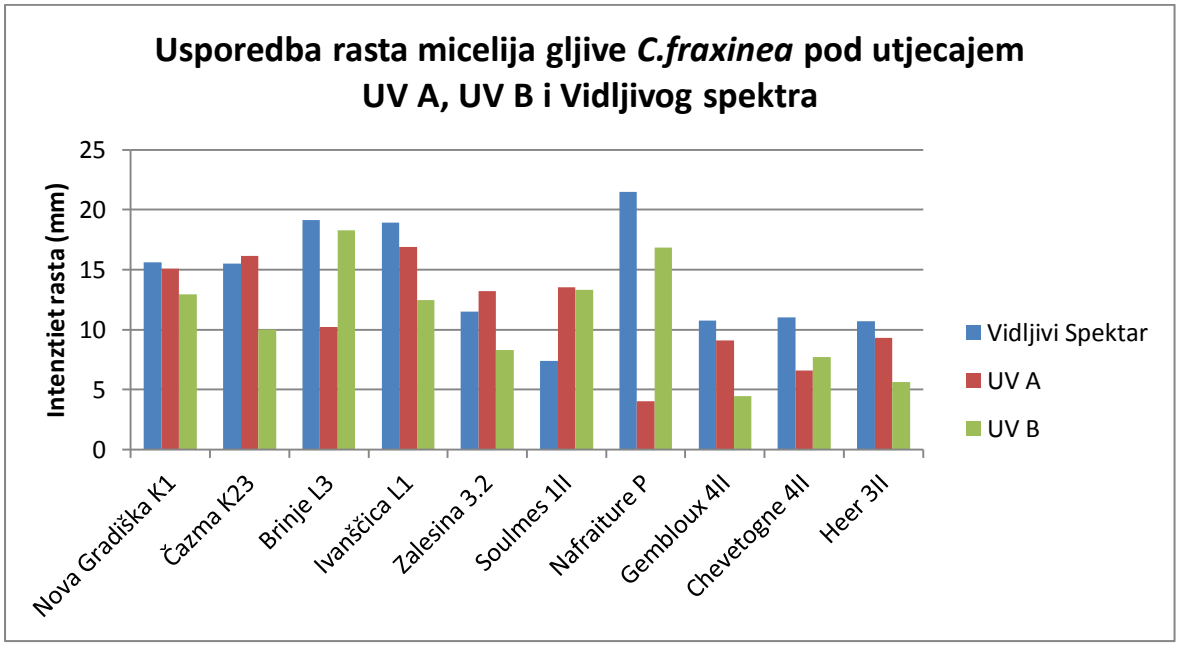
Grafikon 2. . Intenzitet rasta micelija gljive *C. fraxinea* na umjetnoj podlozi pod utjecajem UVA svjetlosti

Za razliku od utjecaja svjetlosti vidljivog sprektra, UVA svjetlost izrazito inhibitorno djeluje na izolat s lokacije Nafraiture P, dok izolati s Hrvatskih lokacije pokazuju i dalje zavidan intenzitet rasta, s tim da izolat Ivanščica L1 raste najvećim intenzitetom i to prosjeka 16,891 milimetar. Ostali izolati s porijeklom iz Kraljevine Belgije rastu sporije i s manjim intenzitetom za razliku od navedenih hrvatskih izolata (grafikon 2.).



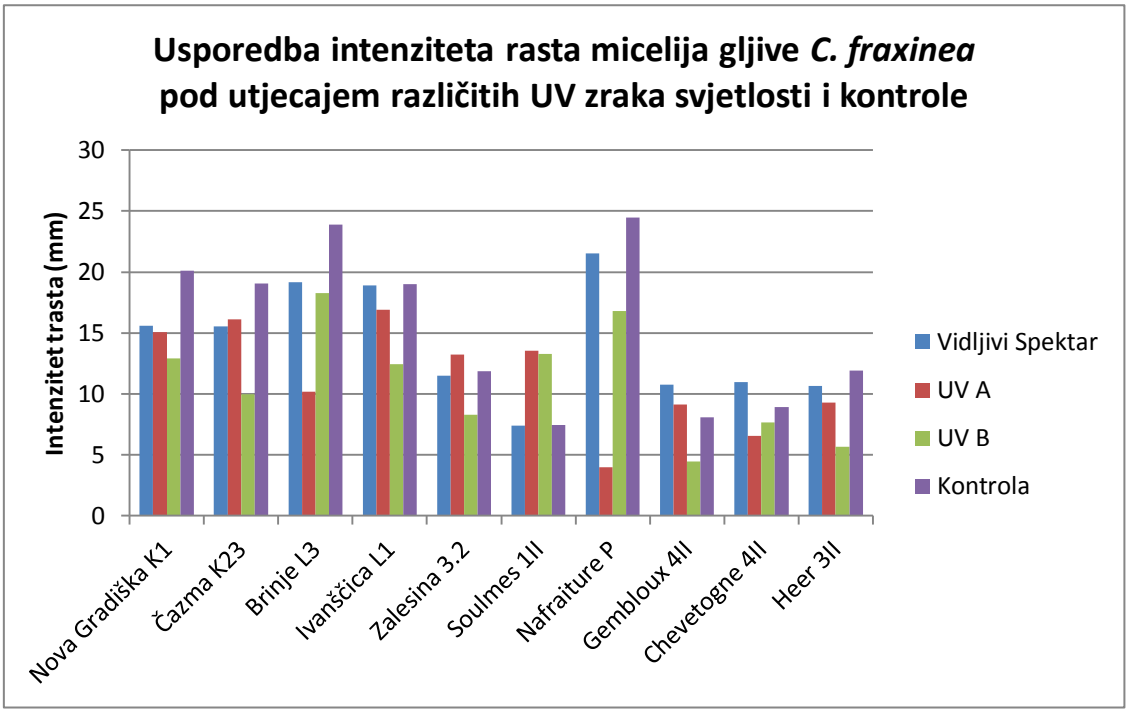
Grafikon 3. Intenzitet rasta micelija gljive *C. fraxinea* na umjetnoj podlozi pod utjecajem UV B svjetlosti

Izolati sa porijeklom iz Hrvatske (Nova Gradiška, Čazma, Brinje, Ivanščica te Zalesina) ne pokazuju inhibitorno djelovanje niti pod utjecajem UVB zraka svjetlosti što upućuje na njihovu izrazitu otpornost i nemogućnost korištenja ovih metoda kao postupka za kontrolu gljive *C. fraxinea.* Najveći intenzitet rasta micelija pod utjecajem ovog tipa svjetlosti ima izolat sa lokacije Brinje L3, dok uočljiivo slabiji intenzitet rasta ima Gembloux 4II. (grafikon 3.)



Grafikon 4. Usporedba rasta micelija gljive *C. fraxinea* pod utjecajem različitih ultraviolentnih zraka svjetlosti

Prema prikazanom grafičkom prikazu s navedenim intenzitetom rasta vidimo kako različiti intenziteti svjetlosti, različitno djeluju na pojedine izolate. Micelij gljive *C. fraxinea* izoliranih s lokacija iz Belgije pokazuju nešto sporiji i smanjeniji rast pod utjecajem UVA te UVB zraka svjetlosti, a pogotovo, kako je i vidljivo.



Grafikon 5. Usporedba intenziteta rasta micelija gljive C.fraxinea pod utjecajem različitih UV zraka svjetlosti i kontrole

Izolati s lokacija iz Hrvatske pokazuju inhibitoran rast micelija pod utjecajem različitih ultraviolentnih zraka svjetlosti u usporedbi sa izolatima pohranjenim u mraku (kontrola), osim izolata sa lokacije Zalesina 3.2 koji pokazuje povoljno djelovanje UV zraka svjetlosti na rast micelija. Izolati sa lokacija iz Kraljevine Belgije pokazuju otpornost na utjecaj navedenih zraka. Jedino izolati lokacije Nafraiture P pokazuju inhibitorno djelovanje UV zraka svjetlosti.

9. ZAKLJUČAK

Izolati sa 10 različitih lokacija pohranjeni su u termo komoru na konstantnu temperaturu i vlagu na period od 21 dan, tijekom kojih su isti podvrgnuti utjecaju različitih ultraviolentnih zraka svjetlosti. Dvaput tjedno mjeren je intenzitet rasta micelija gljive *Chalara fraxinea* čime smo dobili nekoliko bitnih činjenica. Najveći intenzitet rasta micelija pod utjecajem vidljivog spektra svjetlosti imao je izolat imenovan lokacijom Nafraiture P. Također, primjećen je znatno sporiji rast micelija u izolatima s lokacije iz Kraljevine Belgije, u usporedbi s izolatima porijeklom iz Hrvatske. Izolati iz Hrvatske, nadalje, ne pokazuju inhibitoran rast pod utjecajem UVA zraka svjetlosti, dok maloprije opisan lokalitet iz Belgije (Nafraiture P) značajno reagira na utjecaj UVA svjetlosti i raste samo 4 mm, što u usporedbi sa npr. hrvatskim izolatom Ivanščica L1 koji raste 16,891 mm pokazuje zamjetno odstupanje.

UVB svjetlost ne pokazuje značajno inhibitorno djelovanje na rast micelija gljive *C. fraxinea,* a jedini smanjen rast uočava se kod lokacija Gembloux 4II te Heer 3II, čiji rast iznosi 4,45 mm, odnosno 5,64 mm.

Kada navedene rezultate, usporednimo sa kontrolom koja je rasla u uvjetima potpunog mraka, ne pokazuje se značajno inhibitorno djelovanje UV zraka svjetlosti korištenih u testiranjima opisanim u ovom radu. Neki autori, potvrdili su povoljno djelovanje UV zraka svjetlosti na rast apotecija gljive *Chalara fraxinea* (Lach, 1971) što se može usporediti i sa rezultatima testiranja utjecaja različitih zraka ultraviolentne svjetlosti na rast micelija gljive u kontroliranim uvjetima. Primjerice, izolati sa lokacija porijeklom iz Hrvatske pokazuju značajan rast pod utjecajem UVA zraka svjetlosti, što bi se moglo definirati kako povoljan utjecaj navedene svjetlosti na rast micelija ovog patogena. Navedeni navod može potvrditi i reakcija izolata Nafraiture P koji pod utjecajem UVB svjetlosti raste značajnim intenzitetom.

Isto tako, iz rezultata možemo uočiti razlike između izolata uzetih u Hrvatskoj i Belgiji, što također potvrđuje varijabilnost između različitih genotipova jasena na pojedinim lokacijama. Navedene varijabilnosti utvrđene su i izolacijom patogena s lokacija u Poljskoj na MEA agru, gdje su praćenjem morfoloških karakteristika gljive utvrđene razlike u strukturi, boji, brzini rasta i sl.(Kowalski i Bartnik, 2010).

10. DISKUSIJA

Obični jasen jedna je od vrsta koje su u šumama Hrvatske doživjele najveća propadanja i degradacije za koje je zaslužna gljiva *Hymenoscyphus fraxineus*. Uloge ove vrste drveća su nezamjenjive za područja na kojima pridolaze, tako kontinentalna Hrvatska svoju ekologiju šuma između ostalih vrsta tvori i na običnom jasenu, dok šume nizinskih područja, pod utjecajem brojnih vodotoka i povremenih plavljenja čine idealno stanište za pridolazak zajednica poljskog jasena, čijim bi se nestankom značajno narušila ekološka, socijalna, ali i društvena kvaliteta tog područja.

S druge strane pojava patogena poput gljive *Hymenoscyphus fraxineus*nešto je sasvim prirodno i u fitopatološkom svijetu normalno. Brojni životni ciklusi u svijetu šumarstva upravo završavaju s gljivama ili pod njihovim utjecajem i zbog toga je vrlo važno upoznati ovog uzročnika propadanja jasena, ne zato da bi smo ga uništili i uklonili iz šumskih ekosustava, nego zato da bi naučili kako ga kontrolirati i koje mu uvjete osigurati da štete na ovoj vrsti budu manje i ekonomski neznačajnije, a gljiva i dalje svojim prisustvom održi ekološku ravnotežu jasenovih zajednica.

Rad i istraživanje provođeno je i nadam se čini temelj za veća i kvalitetnija znanstvena istraživanja koja su neophodna da bismo shvatili sve utjecaje, prvenstveno ultraviolentnih zraka koje su temelj ovog rada ali i drugih čimbenika.

U budućnosti ovaj rad i početno istraživanje potrebno je proširiti brojem lokacija na kojima je ovaj patogen uočen, zatim kvalitetnijim uvjetima provođenja pokusa sa stalnim temperaturama i vlagom kako bi rezultati došli do visoke točnosti. Isto tako, pokusi bi se trebali ponavljati na različitim temperaturama i koncentracijama vlage kako bi dobiveni rezultati postali približno slični vanjskim uvjetima u kojima se gljiva pojavljuje, jer znamo da su uvjeti u šumskim sastojinama često promjenjivi i vrlo dinamični što sve ima značajan utjecaj na pojavu patogena i njegovo širenje.

S obzirom da je utvrđeno kako izolati dobiveni iz nekrotičnih lezija pokazuju veću patogenost *H. fraxineus* u odnosu na izolate dobivene iz askospora (Kraj et al., 2012, Kraj i Kowalski, 2013), isto bi svakako bilo potrebno dokazati i testom obrađenim u ovom radu.

Također, dokazano je da različiti genotipovi pokazuju određenu rezistentnost na napad patogena *H. fraxineus*ovisno o godini prikupljanja uzoraka (Pliura et al.). Kako bi potvrdili rezultate dobivene ovim radom, testiranje ultraviolentnim zrakama bilo bi poželjno ponoviti tijekom duljeg vremenskog perioda. Navedenim ponavljanjem dokazali bi pojavu eventualne rezistentnosti ili otpornosti na utjecaj UV zraka svjetlosti u laboratorijskim uvjetima. Prema već provedenim testiranjima različitih klonova, uvrđena je pojava patogena u proljeće 2012 godine na 46,9 % testiranih klonova, dok je u istom godišnjem dobu patogen potvrđen na gotovo 100% klonova (Pliura et al., 2014).

Također, pojedine patogene gljive poput *A. gallica* pokazuju usku povezanost sa odumiranjem jasena i uvenućem krošnje, navedene vrste drveća. Kako bi utvrdili njihovu povezanost, te djelovanje UV zraka svjetlosti na druge patogene gljive koje pridolaze na područjima kao i gljiva *Hymenoscyphus fraxineus,* potrebno je izolirati i druge patogene, te ih podvrgnuti različitim UV zrakama svjetlosti, čime bi u budućnosti točno definirali morfološke karakteristike patogena obrađenog u ovom radu.

Znanost još nema mnoštvo informacija o ovom patogenu što još uvijek dovodi do velikih gubitaka jasenovih stabala, ali i mnogih drugih čimbenika koji čine suživot unutar šumskih zajednica. Jednaku pozornost i ulaganja treba usmjeriti kako prema samom patogenu, tako i prema različitim antropogenim utjecajima koji ovu vrstu čine izuzetno neotpornom i osjetljivom na štetnike. Biološka kontrola patogena je budućnost šumarstva i fitopatologije u cjelini, a ovaj rad nadam se čini jednu malu kariku u moru istraživanja i proučavanja gljive *Hymenoscyphus fraxineus* u budućnosti.

11. LITERATURA

- Bakys, R., Vasaitis, R., Barklund, P., Thomsen, I.M., Stenlid, J., 2009b: Occurence and pathogenicity of fungi in necrotic and non-symptomatic shoots of declining common ash (*Fraxinus excelsior*) in Sweden. Eur. J. Forest Res., 128 (1), 51–60
- Bakys, R., Vasaitis, R., Barklund, P., Ihrmark, K., Stenlid, J., 2009a: Investigations concerning the role of *Chalara fraxinea* in declining *Fraxinus excelsior*. Plant Pathol. 58, 284-292
- Barić L., Županić, M., Pernek, M., Diminić, D., 2012: Firts records of *Chalara fraxinea* in Croatia – a new agent of ash dieback (*Fraxinus spp*.). Šumarski list, 136 (9-10), 461-469
- Bengtsson, S.B.K., Vasaitis, R., Kirisits, T., Solheim, H., Stenlid, J. 2012: Population structure of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* and its genetic relationship to *Hymenoscyphusalbidus*. Fung. Ecol. 5, 142 –153
- Cleary, M.R., Daniel, G., Stenlid, J., 2013: Light scaning electron microscopy studies of the early infection stages of *Hymneoscyphus pseudoalbidus* on *Fraxinus excelsior.* Plant Pathology,doi: 10.1111/ppa12048
- Drenkhan, R., Hanso, M., 2010: New host species for *Chalara fraxinea*. New disease reports, 22, 16
- Franjić, J., Škvorc, Ž., 2010: Šumsko drveće i grmlje Hrvatske. Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
- FRAXIGEN, 2005: Ash species in Europe: Biological Characteristics and Practical Guidelines for Sustainable Use. Oxford: Oxford Forestry Institute
- Gross, A., Holdenrieder, O., 2013: On the longevity of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* in petioles of *Fraxinus excelsior*. For. Pathol. 43, 168-170
- Gross, A., Zaffarano, P.L., Duo, A., Grünig, C.R., 2012b: Reproductive mode and life cycle of the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. Fungal Genet. Biol. 49, 975-986
- Idžetić, M., 2005: Listopadno drveće u grmlje u zimskom razdoblju. Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
- Jankovsky, L., Holdenrieder, O., 2009: *Chalara fraxinea* ash dieback in the Czech Republic. Plant Protection Science,45(2), 73-78

- Kiristis, T., Freinschlang, C., 2012: Ash dieback caused by *Hymneoscyphus pseudoalbidus* in a seed plantarion of *Fraxinus excelsior* in Austria. Journal of Agricultural Extension and Rural Development, 4, 181-193
- Kiristis, T., Kritsch, P., Kräutler, K., Matlakova, M., Halmschleager, E., 2012: Ash dieback associated with *Hymneoscyphus pseudoalbidus* in forest nurseries in Austria. Journal of Agricultural Extension and Rural Development, 4, 229-230
- Kirisits, T., Matlakova, M., Mottinger-Kroupa, S., Halmschlager, E., Lakatos, F. 2009a: *Chalara fraxinea* associated with dieback of narrow-leafed ash (*Fraxinus angustifolia*). Plant Pathology, 59 , 402
- Kiristis, T., Matlakova, M., Mottinger-Kroupa, S., Cech, T., Halmschlager, E., 2009: The current situation of ash dieback caused by *Chalara fraxinea* in Austria.
- Kowalski T., Bartnik, C., 2010: Morphological variation in colonies of *Chalara fraxinea* isolated from ash (*Fraxinus excelsior)* stems with symptoms of dieback and effects of temperature on colony growth and structure. Acta Agrobot. 63, 98-105
- Kowalski, T., Holdenrieder, O., 2009: The teleomorph of *Chalara fraxinea*, the causal agent of ash dieback. For. Pathol. 39, 304-308
- Kowalski, T., 2006: *Chalara fraxinea* sp.nov. associated with dieback of ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland. For. Pathol. 36, 257-265
- Krivošić, J., 2014: Dosadašnje spoznaje o fitopatogenoj gljivi *Chalara fraxinea* T. Kowalski – uzročniku odumiranja jasena (*Fraxinus ssp*). Zagreb: Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
- McNeill, J., Barrie, F.F., Buck, W.R., Demoulin, V., Greuter, W., Hawksworth, D.L., Herendeen, P.S., Knapp, S., Marhold, K., Prado, J., Prud'homme van Reine, W.F., Smith, G.F., Wiersemna, J., Turland, N.J., 2012: International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code). Regnum vegetabile no. 154. Königstein: Koeltz Scientific Books
- Pliura, A., Marčiulyniene, D., Bakys, R., Suchockas, V., 2012: Dynamics of genetic resistance to Hymenoscyphus pseudoalbidus in juvenile Fraxinus excelsior clone. Institute of Forestry, Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, 10 - 27

- Schumacher, J., Kehr, R., Leonhard, S., 2010: Mycological and histological investigations of *Fraxinus excelsior* nursery saplings naturally infected by *Chalara fraxinea*. For. Phatol. 40, 419-429
- Schumacher, J., Wulf, A. and Leonhard, S. 2007: Erster Nachweis von *Chalara fraxinea* T. Kowalski sp. nov. in Deutschland – ein Verursacher neuartiger Schäden an Eshen. [First record of *Chalara fraxinea* T. Kowalski sp. nov. in Germany–a new agent of ash decline]. Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenshutzdienstes59, 121-123;
- Wang, Z., Binder, M., Schoch, C.L., Johnston, P.R., Spatafora, J.W., Hibbett, D.S., 2006: Evolution of helotialean fungi (*Leotiomycetes, Pezizomycotina*): a nuclear rDNA phylogeny. Mol. Phylogenet. Evol., 41, 295-312
- Wojciech, K., Zarek, M., Kowalski, T., 2010: Genetic variability of *Chalara fraxinea,* dieback cause of European ash (*Fraxinus excelsior L.*). Mycol. Progress, 1–9
- Zheng, H., Zhuang, W., 2013: Four new species of the genus *Hymenoscyphus* (fungi) based on morphology and molecular data. Sci. Chin. Life Sci., 56, 90-100
- Županić, M., Barić, L., Pernek, M., Diminić, D., 2012: Rasprostranjenost gljive *Chalara fraxinea*. Radovi Hrvat. šumar. Inst., 44(2), 125-134

Mrežni izvori

- http://www.brinje.hr/home.asp?action=home&id=0&glavni=0 pristupljeno 18.9.2016 god.
- http://www.cazma.hr/o-cazmi/ pristupljeno 16.9.2016
- http://www.euforgen.org/fileadmin/bioversity/publications/pdfs/EUFORGEN/855_Technical_guidelines_for_genetic_conservation_and_use_for_common_ash__Fraxinus_excelsior_.pdf:pristupljeno15.9.2016 god.
- https://hr.wikipedia.org/wiki/Obi%C4%8Dni_jasen pristupljeno 12.9.2016

SLIKE I TABLICE

- Bakys, R., Vasaitis, R., Barklund, P., Ihrmark, K., Stenlid, J., 2009a: Investigations concerning the role of *Chalara fraxinea* in declining *Fraxinus excelsior*. Plant Pathol. 58, 284-292
- Danquah, B. W., Costanzo, S., 2013: New Pest Response Guidelines. Ash Dieback (Teleomorph: *Hymenoscyphus pseudoalbidus*; Anamorph: *Chalara fraxinea*). APHIS – USDA; Department of Agriculture, Food and the Marine (2012). DAFM expenditure on Irish Agriculture

SLIKE I TABLICE – mrežni izvori

- www.alamy.com pristupljeno 14.09.2016 god.
- www.amazon.com pristupljeno 10.09.2016 god.
- http://asco-sonneberg.de/pages/gallery/hymenoscyphus-pseudoalbidus-110718-01xs21091.php pristupljeno 18.9.2016 god.
- www.brinje.hr pristupljeno 12.09.2016 god
- www.cazma.hr pristupljeno 12.09.2016 god
- commons.wikimedia.org pristupljeno 14.09.2016 god.
- http://herbaria-old.plants.ox.ac.uk/fraxigen/overview.html pristupljeno 2.9.2016 god.
- https://hr.wikipedia.org/wiki/Obi%C4%8Dni_jasen#/media/File:Fraxinus_excelsior_001.jpgpristupljeno 10.9.2016 god.
- https://hr.wikipedia.org/wiki/Poljski_jasen pristupljeno 10.9.2016 god.
- https://en.wikipedia.org/wiki/Fraxinus_ornus pristupljeno 10.9.2016 god.
- http://www.baumkunde.de/Fraxinus_excelsior pristupljeno 08.9.2016. god.
- http://www.southernbiological.com/)(www.titanbiotechltd.co.in pristupljeno 10.09.2016 god.
- www.schnee-hr.compristupljeno 18.09.2016