Gljive i štetnici sjemena poljskoga jasena (Fraxinus angustifolia Valh)

Bulovec, Ida

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:108:480900

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

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

IDA BULOVEC

GLJIVE I ŠTETNICI SJEMENA POLJSKOGA JASENA (*Fraxinus angustifolia* Vahl)

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2018.

ŠUMARSKI FAKULTET SVEUČILIŠTA U ZAGREBU

ŠUMARSKI ODSJEK

GLJIVE I ŠTETNICI SJEMENA POLJSKOGA JASENA (*Fraxinus angustifolia* Vahl)

DIPLOMSKI RAD

Diplomski studij: Urbano šumarstvo, zaštita prirode i okoliša

Predmet: Integrirana zaštita šuma u zaštićenim područjima

Ispitno povjerenstvo: 1. prof. dr. sc. Danko Diminić

2. prof. dr. sc. Boris Hrašovec

3. dr. sc. Jelena Kranjec Orlović

Studentica: Ida Bulovec

JMBAG: 1191219203

Broj indeksa: 780/16

Datum odobrenja teme: 2. travnja 2018.

Datum predaje rada: 18. rujna 2018.

Datum obrane rada: 28. rujna 2018.

Zagreb, rujan 2018.

Dokumentacijska kartica	
Naslov	Gljive i štetnici sjemena poljskoga jasena (*Fraxinus angustifolia* Vahl)
Title	Fungi and pests of narrow-leaved ash (*Fraxinus angustifolia* Vahl) seeds
Autor	Ida Bulovec
Adresa autora	Bukovačka cesta 302a, Zagreb
Mjesto izrade	Zagreb
Vrsta objave	Diplomski rad
Mentor	prof. dr. sc. Danko Diminić
Izradi rada pomagala	dr. sc. Jelena Kranjec Orlović
Godina objave	2018.
Sadržaj rada	Broj stranica: 34 Broj tablica: 8 Broj slika: 28 Broj navoda literature: 49
Ključne riječi	poljski jasen, sjeme, izolacija gljiva, *Alternaria* sp., *Sphaerulina berberidis, Lignyodes* sp.
Key words	narrow-leaved ash, seed, fungal isolation, *Alternaria* sp., *Sphaerulina berberidis, Lignyodes* sp.
Sažetak	Zbog izraženog odumiranja poljskoga jasena (*Fraxinus angustifolia* Vahl) te izostanka ili slabog uroda sjemena posljednjih godina, cilj rada bio je utvrditi prisutnost potencijalno patogenih gljiva u sjemenu, prvenstveno prisutnost patogene gljive *Hymenoscyphus fraxineus* kao glavnog uzroka odumiranja jasena. Analizirano sjeme sakupljeno je s pet lokacija (šumarije Novoselec, Lipovljani, Gunja, Županja, Vukovar) radi utvrđivanja prisutnih gljiva i štetnika. Sjeme je analizirano klasičnim metodama izolacije gljiva na umjetne hranjive podloge, nakon čega su dobiveni miceliji iz 42 % sjemena identificirani molekularnim metodama. Analizom je utvrđeno 15 različitih taksona gljiva, od kojih su najčešći bili rod *Alternaria* i vrsta *Spahaerulina berberidis* koja do sada nije pronađena na sjemenu jasena. Prisutnost štetnika u sjemenu kvantificirana je

	vizualnim pregledom zdravstvenoga stanja sjemena, a pronađene su dvije vrste kukaca: jasenova pipa iz roda *Lignyodes* i parazitoidna osa na pipi. Postotak napadnutosti sjemena štetnicima iznosio je 5,8 %. Iako je proučavano sjeme poljskoga jasena bilo zdravo i dobroga vitaliteta, osim onoga sjemena napadnutoga jasenovom pipom, velik broj identificiranih gljiva navode se u literaturi kao patogeni sjemena i plodova, a neke i kao oportunistički paraziti prisutni u nekrotičnome tkivu jasena (*Fraxinus* spp.). Navedeni rezultati mogu upućivati na moguće smanjenje vitaliteta sjemena kroz dulji period skladištenja i u uvjetima povećane vlage. Patogen *Hymenoscyphus fraxineus* nije utvrđen ni na jednome sjemenu.
Abstract	Due to the prominent dieback of the narrow-leaved ash (*Fraxinus angustifolia* Vahl) and the absence or low seed yield over the last few years, the aim of this study was to establish the presence of potentially pathogenic fungi and pests in seeds as well as to determine the presence of the pathogenic fungus *Hymenoscyphus fraxineus* in seeds, since this fungus is the main reason for ash dieback. The analysed seeds were collected from five locations (forest offices Novoselec, Lipovljani, Gunja, Županja, Vukovar). These seeds were analysed by the classical fungal isolation methods onto the artificial nutrient media, after which the obtained mycelia from 42% of the seeds were identified by the molecular methods. The analysis showed 15 different fungal taxons. The most common was the genus *Alternaria* and the species *Spahaerulina berberidis*, which has not been found on the ash seed so far. The presence of pests in the seed was quantified by visual inspection of the seeds, and two types of insects were found: the ash weevil from the genus *Lignyodes* and the parasitic wasp on the weevil. The percentage of the seed attacked by pests was 5.8%. Although a large number of identified fungi have previously been described as seed and fruit pathogens, and some as opportunistic ash (*Fraxinus* spp.) parasites, all of the inspected seeds were of good vitality, with the exception of the seeds attacked by the ash weevil. These results may indicate a possible reduction of seed vitality over longer storage periods and in conditions of increased moisture. Pathogenic fungus *Hymenoscyphus fraxineus* was not found in the seeds of narrow-leaved ash.

	IZJAVA O IZVORNOSTI RADA	**OB ŠF 05 07**
		Revizija: 1
		Datum: 28. 6. 2017.

„Izjavljujem da je moj diplomski rad izvorni rezultat mojega rada te da se u izradi istoga nisam koristila drugim izvorima osim onih koji su u njemu navedeni.“

_____

Ida Bulovec

U Zagrebu 18. rujna 2018.

Sadržaj

1. Uvod 1

1.1. Poljski jasen (*Fraxinus angustifolia* Vahl) 2

1.2. Sjeme poljskoga jasena 5

2. Materijali i metode 7

2.1. Izolacija micelija gljiva iz sjemena poljskoga jasena 8

2.2. Identifikacija taksona dobivenih micelija molekularnim metodama 10

2.3. Analiza prisutnosti štetnika u sjemenu 13

3. Rezultati 14

3.1. Rezultati istraživanja prisutnosti gljiva na sjemenu poljskoga jasena 14

3.2. Rezultati istraživanja prisutnosti štetnika na sjemenu poljskoga jasena 17

4. Rasprava 19

4.1. Gljive pronađene u sjemenu poljskoga jasena 19

4.1.1. Rod *Alternaria* 19

4.1.2. *Sphaerulina berberidis* (Niessl) Quaedvl., Verkley & Crous 21

4.1.3. Ostali taksoni gljiva u sjemenu jasena 22

4.1.4. Izostanak gljive *Hymenoscyphus fraxineus* u sjemenu 25

4.2. Štetnici pronađeni u sjemenu jasena 26

4.2.1. Rod Lignyodes 26

4.2.2. Parazitoidna osa 28

5. Zaključak 29

6. Popis literature 30

Popis slika:

Slika 1. Postoci stabala sa značajnom osutosti krošnje u razdoblju od 2007 do 2017. godine. 1

Slika 2. Šuma poljskoga jasena s kasnim drijemovcem. 4

Slika 3. Degradirana satojina jasena u blizini Karlovca. 4

Slika 4. Perutka poljskoga jasena. 5

Slika 5. Sjemenka poljskoga jasena. 5

Slika 6. Papirnate vrečice sa sjemenom. 7

Slika 7. Tri polovice sjemena na hranjivoj podlozi. 9

Slika 8. Priprema za postupak presađivanja micelija. 9

Slika 9. Posupak tretiranja uzorka tekućim dušukom. 10

Slika 10. PCR uređaj. 12

Slika 11. Grafički prikaz raspodjele razvijenih micelija po lokacijama. 15

Slika 12. Raspodjela napadnutih sjemenki po lokacijama. 18

Slika 13. Miceliji od *Alternaria* ssp. (Vukovar). 20

Slika 14. *Alternaria tenuissima.* 20

Slika 15. *Sphaerulina berberidis* (Gunja). 21

Slika 16. Cladosporium ssp. 22

Slika 17. *Cladosporium cladosporioides.* 23

Slika 18. *Cladosporium herbarum.* 23

Slika 19. Diaporthe ssp. (Lipovljani). 23

Slika 20. *Fusarium oxysporum.* 24

S**lika 21**. *Penicillium* (Vukovar). 25

Slika 22. *Venturia fraxini* (Županja) 25

Slika 23. Ličinka iz porodice *Lygniodes.* 26

Slika 24. Ličinka iz porodice *Lygniodes.* 26

Slika 25. Područje rasprostranjenosti *Lignyodes bischoffi.* 27

Slika 26. Područje rasprostranjenosti *Lignyodes enucleator*. 27

Slika 27. Područje rasprostranjenosti *Lignyodes suturatus*..... 27

Slika 29. Parazitoidna osica. 28

Slika 28. Acefalna pagusjenica. 28

Popis tablica:

Tablica 1. Lokacije i datumi sakupljanja sjemena poljskoga jasena. 7

Tablica 2. Koncentracije pojedinih sastojaka smjese za PCR. 11

Tablica 3. Uvjeti lančane reakcije polimerazom 11

Tablica 4. Udio sjemena u kojem su se razvile gljive izolacijom na MEA hranjivu podlogu..... 14

Tablica 5. Rezultati analize svih uzoraka. 15

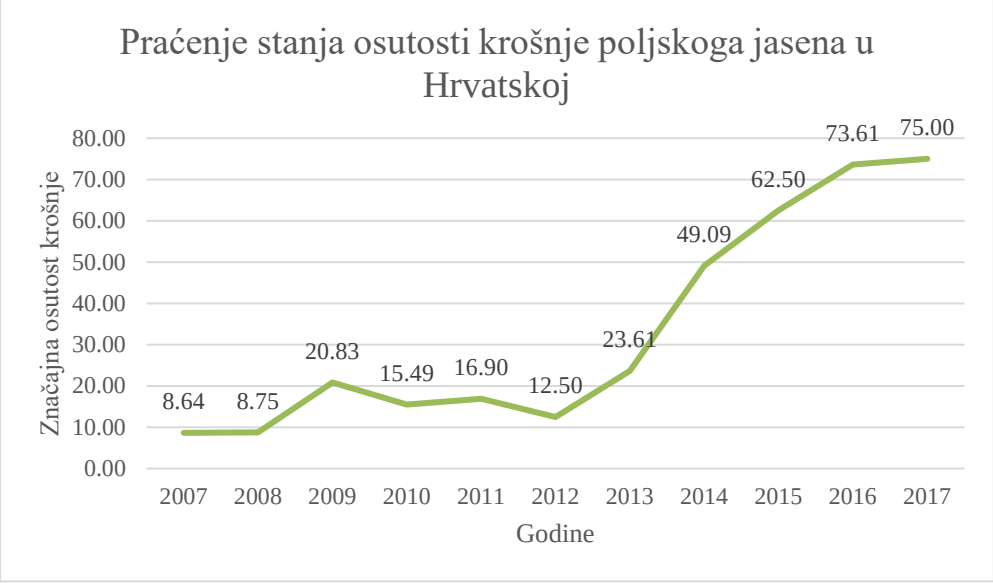
Tablica 6. Rezultati istraživanja sortitrani po taksonima..... 16

Tablica 7. Pregled otkrivenih taksona za svaku lokaciju..... 17

Tablica 8. Udjeli utvrđenih štetnika po lokacijama. 18

1. Uvod

Poljski jasen (*Fraxinus angustifolia* Vahl) jedna je od ekološki i ekonomski najznačajnijih vrsta nizinskih šuma, a trenutno i jedna od najugroženijih vrsta drveća u Republici Hrvatskoj s vrlo visokim postotkom odumiranja. U podacima nedavnih istraživanja uključenih u program *ICP Forests* iz 2017. godine (Potočić i sur. 2018) zabilježeno je značajno odumiranje krošnje na čak 75 % uzorkovanih stabala poljskoga jasena. Na *slici 1* grafički je prikazano pogoršanje zdravstvenoga stanja poljskoga jasena u Republici Hrvatskoj za razdoblje od 2007. do 2017. godine; odnosno prikazani su podaci značajne osutosti krošnje dobiveni sustavnim praćenjem stanja jasena u sklopu programa *ICP Forests.* U dosadašnjim istraživanjima otkriveno je da, uz ostale uzroke, u odumiranju poljskoga jasena najveći značaj imaju parazitske gljive koje uzrokuju odumiranje korijena i krošnje, posebno patogen *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya, za kojeg je potvrđeno da je primarni uzročnik odumiranja krošnje poljskoga jasena (Diminić 2015, Milotić i sur. 2016). Patogen *Hymenoscyphus fraxineus* uzrokuje masovna odumiranja poljskoga i običnoga jasena (*Fraxinus excelsior* L.) diljem Europe. Prisutnost ovoga patogena potvrđena je u skoro svim dijelovima stabala: u korijenu, granama, izbojcima, peteljkama i listovima (Kowalski 2006, Gross i sur. 2014) te je otkriveno s relativno malim udjelom i u zdravom i simptomatičnom sjemenu jasena sakupljenoga u sastojinama u Latviji i Švedskoj (Cleary i sur. 2013, Hayatgheibi 2013, Marčiulynienė i sur. 2018).



Slika 1. Udjeli stabala sa značajnom osutošću krošnje u razdoblju od 2007. do 2017. godine.

Prisutnost patogenih gljiva u sjemenu šumskoga drveća često uzrokuje propadanja sjemena, smanjenu vitalnost te moguće propadanje sadnica nakon same sjetve, kao što je polijeganje ponika, odumiranje izbojaka i cijelih sadnica, rakaste tvorevine starijih sadnica i slično. Dok neki patogeni uzrokuju propadanje, postoje i mnoge vrste endofita i saprotrofa koji ne utječu na vitalnost sjemena (Mittal i Wang 1987).

U sastojinama poljskoga jasena u Republici Hrvatskoj otkriven je slučaj odumiranja sadnica uzrokovan patogenom *Hymenoscyphus fraxineus* otprilike mjesec dana nakon same sadnje, iako taj patogen nije bio pronađen u starijim stablima poljskoga jasena u blizini samih sadnica. Sadnice na kojima je utvrđena prisutnost patogena *Hymenoscyphus fraxineus* uzgojene su u rasadniku Zalužje (Uprava šuma Vinkovci), a presađene su na terenu u odsjek 91b gospodarske jedinice Vrbanske šume, također UŠP Vinkovci. Upravo ovo otkriće dovelo je do pitanja postoji li u samome sjemenu taj patogen, koji se tijekom rasta sadnica proširi na mladu biljku i uzrokuje simptome odumiranja. Budući da su istraživanja na sjemenu jasena podzastupljena, a u Republici Hrvatskoj se do sada nitko time nije bavio, ne zna se u kakvome je stanju sjeme poljskoga jasena s fitopatološke i entomološke strane.

U ovome radu cilj je utvrditi prisutnost patogena *Hymenoscyphus fraxineus* u sjemenu poljskoga jasena te utvrditi koje se još bolesti i štetnici nalaze u sjemenu kako bi se procijenilo zdravstveno stanje i vitalitet sjemena prikupljenoga s registriranih sjemenskih izvora i sjemenskih sastojina za buduću proizvodnju sadnica.

1.1. Poljski jasen (*Fraxinus angustifolia* Vahl)

Prema Franjiću i Škvorcu (2010) poljski se jasen rasprostire na području Europe (Mediteran, Panonija), zapadne Azije te sjeverne Afrike. Najčešće raste na područjima uz rijeke jadranskoga sliva i u panonskim nizinskim šumama budući da je higrofilna vrsta te dobro podnosi poplavnu i visoke razine podzemne vode. Anemofilna je i listopadna vrsta te se razmnožava sjemenom.

Također, Franjić i Škvorc (2010) navode kako poljski jasen najčešće raste kao stablo visine oko 15 m, ali u povoljnim prilikama izraste i do preko 30 m te dostigne promjer do jednoga metra. Krošnja mu je duguljasto ovalna, zaobljena, s relativno gustim granama. Kora debla na početku je glatka, tanka te kasnije odeblja i ispuca uzdužno i poprijeko u male višekutne pločice te postane siva. Pupovi su manji nego kod običnoga jasena (*Fraxinus excelsior* L.), svijetlosivi do

tamnosmeđi, pustenasti, gdje je terminalni pup najkrupniji. Listovi su neparno-perasto sastavljeni od 7 do 11 polimorfnih liski koje su na rubovima nejednoliko, krupno i nepravilno pilaste.

Matić i sur. (2005) navode kako dosadašnja istraživanja šumskouzgojnih svojstava i ekološke konstitucije pokazuju da poljski jasen ima svojstva pionirske vrste nizinskih šuma. Poljski jasen vrsta je koja dobro raste na vlažnim bogatim glinovitim tlima u nizama i dobro dreniranim tlima na gredama. Najbolje uspijeva na bogatim tlima nižih nadmorskih visina i dobro podnosi poplave. Preferira prozračena i umjereno zbijena glinovita tla, iako raste na ilovastim i pjeskovito ilovastim tlima s većim udjelom gline u rasponu pH od 5,0 do 8,0. Poljski jasen zahtijeva umjerenu klimu s prosječnim količinama padalina od 400 do 800 mm. Takvi uvjeti osiguravaju povoljne uvjete rasta 6 do 7 mjeseci. Pripada u skupinu heliofilnih vrsta, koje zahtijevaju 60 – 100 % ukupnoga izravnoga svijetla.

Prema Vukeliću (2012) poljski je jasen dominantna vrsta u šumskim zajednicama periodično poplavljenih područja i vlažnih nizinskih šuma. Poljski je jasen glavna vrsta triju šumskih zajednica pa Vukelić (2012: 69–70) navodi sljedeće: „U širim depresijama u poplavnoj zoni Save i njezinih pritoka raste šuma poljskoga jasena s kasnim drijemovcem (*Leucojo–Fraxinetum angustifoliae*)(*slika 2*), na nešto višim, zaravnjenim i sušim nizama u Podravini mješovite šume crne johe i poljskoga jasena (*Pruno padi–Fraxinetum angustifoliae*), a na najvišim terenima Podunavlja i Podravine unutar poplavnih šuma vrba i topola nalaze se fragmenti šume veza i poljskog jasena (*Fraxino angustifolii–Ulmetum laevis*)“. Autor također ističe višestruku važnost poljskoga jasena u nizinskim šumama kao pionirske vrste, zatim kao edifikatora u srednjedobnim i starijim sastojinama, a važna je i njegova uloga u sanaciji šumskih površina na kojima se počeo sušiti hrast lužnjak zbog promjene stanišnih uvjeta koji upravo odgovaraju poljskomu jasenu. Iz navedenih tvrdnji o poljskome jasenu jasno je vidljiva njegova velika ekološka važnost: njegovo propadanje (*slika 3*) može dovesti do propadanja mnogih šumskih zajednica i cijelih ekosustava te je zbog svojih jedinstvenih ekoloških svojstava u Hrvatskoj nezamjenjiva vrsta.



Slika 2. Šuma poljskoga jasena s kasnim drijemovcem.



Slika 3. Degradirana sastojina poljskoga jasena u blizini Karlovca.

1.2. Sjeme poljskoga jasena

Prema Idžojtić (2013) poljski je jasen anemofilna vrsta koja počinje cvjetati u starosti od 8 do 10 godina. Stabla mogu biti dvospolna ili jednospolna muška. Plodovi dozrijevaju u rujnu te nakon dozrijevanja dugo ostaju na izbojcima. To su duguljaste, smeđe, sjajne, 3,5 – 4,5 cm dugačke perutke (jednosjemeni oraščići na vrhu okriljeni jednim krilcem) (*slika 4*) koje su sakupljene u visećim grozdovima. Sam oraščić duguljasto je eliptičan, plosnat, uzdužno plitko izbrazdan, najčešće duži od polovice perutke, dok je krilce perutke također plosnato, duguljasto te na vrhu suženo. Sama sjemenka dugačka je oko 1,5 cm i široka oko 5 mm (*slika 5*). Masa 1000 plodova iznosi 60 – 80 g. Plodovi mogu biti anemohorni i hidrohorni.



Slika 4. Perutka poljskoga jasena.



Slika 5. Sjemenka poljskoga jasena.

Drvodelić i Oršanić (2016) navode kako se prema Young i Young (1992) sjeme jasena sa sadržajem vlage od 7 do 10 % čuva bez gubitka vitaliteta do 7 godina u hermetički zatvorenim posudama na temperaturi od 5 °C. S obzirom na to da sjeme ostaje vitalno do 7 godina, može ga se svrstati u grupu mezobiotskoga sjemena, koje u prirodi zadržava svoj vitalitet od 3 do 15 godina.

U istraživanju u kojemu se procjenjivao vitalitet svježe sakupljenoga i preležanoga sjemena poljskoga jasena (Drvodelić i Oršanić 2016) utvrđen je visok postotak vitalnosti svježe sakupljenoga sjemena poljskoga jasena (91 %). Od 9 % nevitalnoga sjemena, postotak šturoga sjemena iznosio je 5 %, a insektima napadnuto sjeme imalo je postotak od 3 %, ostatak sjemena imao je nekroze i neobojene površine embrija i endosperma. Kod preležanoga sjemena vitalitet je iznosio 87 %. Kod nevitalnoga sjemena primijećeno je kako najprije dolazi do nekroza i truleži na embriju koje se dalje šire na endosperm. U zaključku istraživanja navodi se kako je optimalno vrijeme sakupljanja sjemena za uspješnu sjetvu druga polovica kolovoza, zbog vrlo visoka vitaliteta takva sjemena. Također, autori navode veliku važnost u odabiru optimalne vrste i trajanja predsjetvene pripreme, uzimajući u obzir mikroreljefne različitosti rasta matičnih stabala s kojih je sakupljano sjeme.

U Republici Hrvatskoj se do sada bolestima i štetnicima sjemena poljskoga jasena još nitko nije bavio, dok i u ostatku Europe nema mnogo istraživanja. Vršena su istraživanja na sjemenu običnoga jasena (*Fraxinus excelsior* L.) na području Švedske i Latvije (Cleary i sur. 2013, Hayatgheibi 2013, Marčiulynienė et al. 2018), u kojima je glavni cilj istraživanja bio utvrditi prisutnost gljive *Hymenoscyphus fraxineus* u sjemenu, dok se ostalim gljivama nije mnogo bavilo. Općenito, Glavaš (1999) navodi kako „većina gljiva na sjemenu i plodovima nisu specifični paraziti. Mogu uzrokovati slabljenje sjemena i smanjenje klijavosti, a neke dovode do potpune destrukcije sjemena. Gljive napadaju zametak za vrijeme cvjetanja, za vrijeme rasta i dozrijevanja plodova, plodove i sjeme uvelo na zemlji, za vrijeme transporta i u skladištima. Mikroflora se sjemena mijenja ovisno o temperaturi, vlazi i vitalnosti sjemena“. Nadalje, autor dijeli gljive na sjemenu u dvije skupine. U jednoj su skupini brojne nespecifične plijesni koje pri povišenoj vlazi naseljavaju vanjske ljuske sjemena ili ga naseljavaju tek nakon oštećenja, kao što su oštećenja od kukaca. Tu su najvažniji rodovi *Alternaria, Fusarium, Penicillium, Rhizopsis* i *Trichotecium.* U drugoj su skupini specifične vrste gljiva koje su u stanju prodrijeti u unutrašnjost sjemena i uzrokovati trulež. Rodovi druge skupine gljiva su *Rhizoctonia* i *Ciboria.* Bolesti sjemena i plodova mogu biti mumifikacija sjemena, trulež plodova, deformacije plodova i sjemena, pjegavost plodova i sjemena te pljesnivost plodova i sjemena.

2. Materijali i metode

Sjeme poljskoga jasena sakupljeno je u razdoblju od kolovoza do studenoga 2017. godine s vizualno zdravih stabala s područja pet šumskih sastojina registriranih za sakupljanje i proizvodnju sjemena poljskoga jasena. Točne lokacije i datumi sakupljanja sjemena za istraživanje prikazani su u *tablici 1*. Četiri su sastojine registrirane kao sjemenski izvori, dok je jedna registrirana kao sjemenska sastojina. Sjeme je testirano na prisutnost patogena nakon jednog do dva mjeseca skladištenja te je utvrđivana prisutnost štetnika nakon približno četiri mjeseca. Sjeme je čuvano na sobnoj temperaturi u papirnatim vrećicama (*slika 6*). Za utvrđivanje prisutnih gljiva korištene su metode izolacije micelija na hranjivoj podlozi te molekularne metode identifikacije vrsta. Za utvrđivanje štetnika korištena je vizualna metoda gdje je odvajano oštećeno sjeme i sjeme s prisutnošću ličinki.

Tablica 1. Lokacije i datumi sakupljanja sjemena poljskoga jasena.

Lokacija sjemenskih sastojina		**Datumi sakupljanja sjemena u 2017. godini**
Šumarija	**Sjemenski objekti**	
Novoselec	HR-FAN-SI-123/366	22. 8. – 6. 9.
Lipovljani	HR-FAN-SS-123/160	21. 8. – 15. 9.
Gunja	HR-FAN-SI-121/011	25. 8. – 3. 10.
Županja	HR-FAN-SI-121/305	23. 8. – 30. 8.
Vukovar	HR-FAN-SI-111/030	23. 8. – 6. 9.



Slika 6. Papirnate vrećice sa sjemenom.

2.1. Izolacija micelija gljiva iz sjemena poljskoga jasena

Sa svake lokacije s koje je sakupljeno sjeme poljskoga jasena nasumično je odabrano 12 plodova koji su se koristili za daljnje istraživanje. Postupak izolacije micelija vršio se u nekoliko koraka. Prvi je korak napravljen 28. 9. 2017. za lokacije Novoselec i Lipovljani te 2. 11. 2017. za lokacije Vukovar, Županja i Gunja. Sjemenke su prvo očišćene od perutki te su površinski sterilizirane uranjanjem u 5 %-tnu otopinu natrijevog hipoklorita (NaOCl) na točno jednu minutu. Nakon površinske sterilizacije sjeme je isprano u sterilnoj destiliranoj vodi (sterilizacija u autoklavu na 121 °C, 20 min) tri puta te je ostavljeno u laminarnom kabinetu za rad u atmosferi čistoga zraka kako bi se u potpunosti osušilo. Aseptičkim metodama[1] sjeme je prepolovljeno te su po tri polovice sjemena stavljane u Petrijeve zdjelice promjera 90 mm na hranjivu podlogu MEA[2] obogaćenu antibiotikom (streptomicin sulfat, 0,2 g/L, Sigma–Aldrich, SAD) (*slika 8*). Svaka Petrijeva zdjelica označena je datumom, prvim slovima lokacije i brojem sjemena, a s donje je strane svaka polovica označena brojem za lakše praćenje rezultata. Petrijeve zdjelice zatvorene su poklopcima te pohranjene u komoru rasta u tamu na 20 ˚C. Kontrola razvoja micelija obavljena je na sljedeće datume: 3. 10., 5. 10., 9. 10., 17. 10., 6. 11., 9. 11., 13. 11. Posljednja kontrola izvršena je 23. 11. 2017. godine. Svi novonastali miceliji presađivani su u zasebne Petrijeve zdjelice promjera 50 mm s hranjivim MEA podlogama kako bi se razvile čiste kulture gljiva (*slika 7*). Čiste uzgojene kulture grupirane su u morfotipove nakon čega je vršena DNK analiza reprezentativnih izolata iz svake grupe dobivenih micelija. Grupiranje po morfotipovima vršeno je na temelju morfoloških značajki promatranih golim okom. Morfološke značajke uključivale su boju i teksturu micelija, obojenje hranjive podloge, boju na poleđini Petrijeve zdjelice, brzinu rasta micelija te prisutnost rizomorfa (Kranjec 2017). Za svaki pojedini morfotip najčešće je odabran jedan reprezentativan izolat, a u iznimnim slučajevima i više, ako je to bilo potrebno zbog premale mase izolata za identifikaciju molekularnim metodama. Za potrebe izolacije DNK odabrani izolati uzgojeni su na MEA hranjivoj podlozi na koju su položeni sterilni celofanski diskovi (Cellophane Membrane Backing, Bio-Rad, SAD) veličine Petrijeve zdjelice, kako bi se za daljnju analizu mogli uzimati čisti uzorci micelija bez dijelova hranjive podloge.

[1] Aseptičke metode uključuju rad u laminarnom kabinetu za rad u atmosferi čistoga zraka, koristeći sterilni pribor kako ne bi došlo do kontaminacije.

[2] MEA – Malt Extract Agar, ThermoFisher scientific, SAD.



Slika 8. Tri polovice sjemena na hranjivoj podlozi.



Slika 7. Priprema za postupak presađivanja micelija.

2.2. Identifikacija taksona dobivenih micelija molekularnim metodama

Izolacija DNK vršena je fenol-kloroform metodom (Allemann i sur. 1999) uz određene prilagodbe (Kranjec 2017). Za svaki pojedini izolat odvagano je približno 50 mg micelija. Odvagani miceliji mehanički su homogenizirani tučkom u mikroepruvetama volumena 2 ml uz prisutnost tekućega dušika (N_2) (*slika 9*). Nakon tog postupka u svaku je epruvetu dodano po 800 µl pufera za lizu (20 mM Tris, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10 % SDS, pH 8) i jednak volumen smjese fenola, kloroforma i izoamilnog alkohola u omjeru 25 : 24 : 1. Tako pripremljene mikroepruvete podvrgnute su miješanju na vrtložnoj miješalici te potom centrifugiranju (Eppendorf AG 5804 R laboratorijska centrifuga) u trajanju od 10 minuta na 5000×g. Nakon cetrifugiranja pipetom je izdvojena vodena faza (približno 400 µl) u kojoj se nalazi DNK u novu mikroepruvetu u koju je dodan jednak volumen otopine kloroforma i izoamilnoga alkohola u omjeru 24 : 1 kako bi se uklonili zaostaci proteina, ugljikohidrata i fenola. Mikroepruvete je zatim bilo potrebno rukom snažno protresti te ponovno staviti na centrifugiranje na 10 min na 5000×g, nakon čega je ponovno pipetom izdvojena vodena faza (približno 350 µl) u koju je dodan jednak volumen izopropanola koji služi za taloženje DNK. Nakon ovog postupka slijedilo je ručno miješanje mikroepruveta okretanjem te centrifugiranje u trajanju od 20 minuta na 15000×g i 4 °C, nakon čega je supernatant dekantiran, a dobiveni talog DNK ispran s 500 µl ledeno-hladnoga 70 %-tnog etanola. Nakon centrifugiranja 3 minute na 15000×g i 4 °C etanol je dekantiran, a talog DNK osušen približno 10 minuta na zraku te naposljetku otopljen u 50 µl TE pufera (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) te je u tome obliku pohranjen na 4 °C do daljnje obrade kako bi se nukleinske kiseline hidratizirale i u potpunosti otopile.



Slika 9. Posupak tretiranja uzorka tekućim dušikom.

U lančanoj reakciji polimerazom (PCR) umnažana je ITS regija izolirane genomske DNK (Schoch i sur. 2012) korištenjem početnica ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') i ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') (White i sur. 1990). Konačne koncentracije pojedinih sastojaka smjese za PCR (*tablica 2*) te uvjeti reakcije (*tablica* 3) određeni su empirijski.

Tablica 2. Koncentracije pojedinih sastojaka smjese za PCR.

Sastojak*	**Početna koncentracija**	**Konačna koncentracija za reakciju**	**Volumen za 1 reakciju (µl)**
Taq DNA polimeraza	5 U/µl	1 U/50 µl	0,2
početnica ITS1	10 µM	0,4 µM	2
početnica ITS4	10 µM	0,4 µM	2
dNTP smjesa	10 mM	0,2 mM	1
$MgCl_2$	25 mM	1,5 mM	3
pufer za PCR	10 x	1 x	5
sterilna H_2O	-	-	35,8
DNA kalup	-	3-90 ng/µl	1
		Ukupno	50

** Za PCR su korišteni reagensi proizvođača Sigma-Aldrich (SAD)*

Tablica 3. Uvjeti lančane reakcije polimerazom

Početna denaturacija	**35 ciklusa**			**Završno produljivanje lanca DNK**
	Denaturacija	**Sparivanje početnica**	**Produljivanje lanca DNK**	
5 min na 95 °C	30 s na 95 °C	45 s na 50 °C	90 s na 72 °C	5 min na 72 °C

Sve su se PCR reakcije izvodile na uređaju Eppendorf AG Mastercycler EP Gradient u pojedinačnom volumenu od 50 µl (*slika 10*). Tijekom svakog izvođenja reakcije uključena je i negativna kontrola (1 µl sterilne H_2O umjesto DNK kalupa). Dobiveni PCR produkti su nakon provjere elektroforezom u agaroznom gelu bili pohranjeni na –20 °C do pripreme za slanje na određivanje slijeda nukleotida (sekvenciranje).

Specifičnost, duljina (pb) te približna koncentracija dobivenih PCR produkata provjerene su elektroforezom u 1,5 %-tnom agaroznom gelu (0,375 g agaroze u 25 ml 1x TBE (89 mM Tris-borat, 2 mM EDTA) pufera, Lonza Rockland, SAD) pri naponu od 55 V, u trajanju od 90 minuta.

U gel se prethodno dodavala boja za vizualizaciju nukleinskih kiselina GelStar Nucleic Acid Gel Stain (Lonza Rockland, SAD) konačne koncentracije 1x. U jažice gela nanošeno je po 1 µl svakog PCR produkta pomiješanog s 4 µl sterilne destilirane vode (razrjeđenje zbog visoke koncentracije dobivenih produkata) te 1 µl pufera za nanošenje uzoraka (6x DNA Loading Buffer, TransGen Biotech, Kina). Tijekom svake izvođene elektroforeze u jednu je od jažica nanošen molekularni marker poznate veličine (100 bp DNA Ladder, TransGen Biotech, Kina) radi procjene duljine i koncentracije PCR produkata. Nakon završene elektroforeze su PCR produkti na gelu vizualizirani te fotografirani s pomoću UV transiluminatora s kamerom (Bio-Imaging Systems DNR, MiniBIS Pro) te računalnoga programa GelCapture. Približna duljina PCR produkata određena je s pomoću računalnoga programa GelAnalyzer 2010a (www.GelAnalyzer.com).



Slika 10. PCR uređaj.

Izolacija genomske DNK iz odabranih čistih kultura micelija te umnažanje ciljanih sekvenci (ITS regije) u lančanoj reakciji polimerazom (PCR) izvršeni su u Molekularno-biološkome laboratoriju Zavoda za šumarsku genetiku, dendrologiju i botaniku na Šumarskome fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Dobiveni nepročišćeni PCR produkti slani su u Macrogen Inc. (Amsterdam, Nizozemska) na sekvenciranje.

Kromatogrami dobiveni sekvenciranjem provjereni su i obrađeni u računalnome programu BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.2.5 (Hall 1999). Izolati su identificirani usporedbom obrađenih sekvenci s postojećima u bazi gena NCBI GenBank primjenom algoritma BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul i sur. 1990). Za identifikaciju na razini vrste u obzir su uzimane sekvence s podudarnošću od najmanje 98 % na najmanje 80 % duljine ispitivane sekvence, dok su one s podudarnošću 94 – 97 % na također najmanje 80 % duljine ispitivane sekvence korištene za identifikaciju na razini roda ili druge više taksonomske jedinice (Bakys i sur. 2009a, Bakys i sur. 2009b, Bakys i sur. 2011). Znanstveni nazivi taksona preuzeti su s mrežne stranice www.indexfungorum.org.

2.3. Analiza prisutnosti štetnika u sjemenu

Za detekciju i proučavanje štetnika na sjemenu poljskoga jasena sa svake je lokacije nasumično izdvojen uzorak od 100 plodova. Nakon što su se uklonile perutke, vizualnom se metodom odvajalo u potpunosti zdravo sjeme od sjemena koje pokazuje znakove napada štetnika, kao što su manje nekroze na dijelu sjemena, rupe od ličinki i slične promjene te pojava samih ličinki. Sjeme za koje se pretpostavilo da je napadnuto štetnicima pohranilo se u mikroepruvete s poklopcem u koje je dodan 95 %-tni etilni alkohol (*slika 11*), kako se uzorci sa štetnicima ne bi osušili. Nakon što je izvršena analiza svih 5 lokacija, svo izdvojeno sjeme pregledano je pod laboratorijskim stereoskopskim mikroskopom (Leica Microsystems, MZ8) kako bi se detektirali štetnici. Ličinke i imaga štetnika fotografirani su digitalnom kamerom (Olympus, SP-500UZ) pričvršćenom na mikroskop te su fotografije analizirane na računalu. Proučavanjem morfoloških karakteristika pronađenih štetnika izvršena je njihova identifikacija.

3. Rezultati

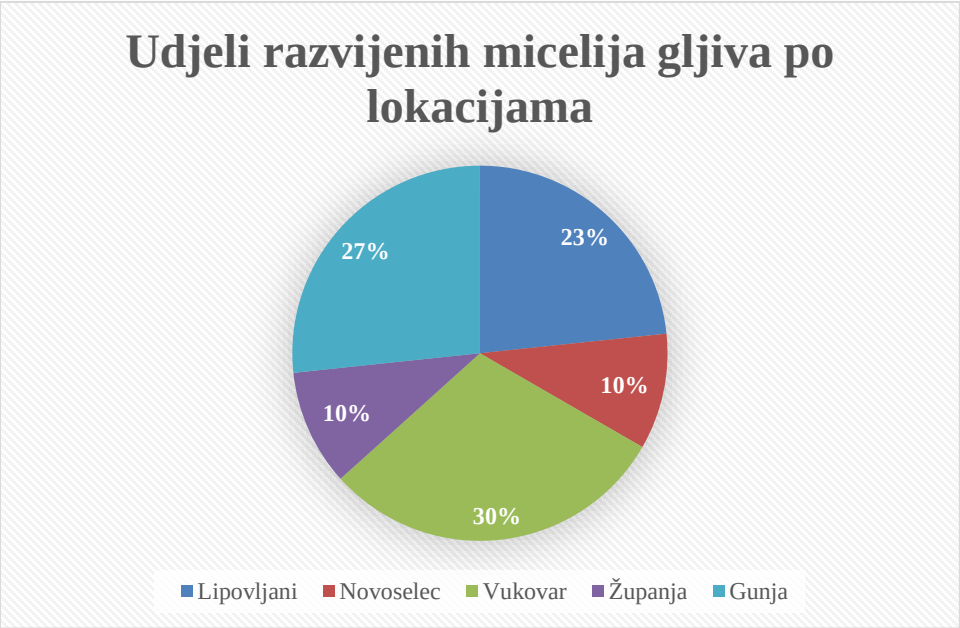
3.1. Rezultati istraživanja prisutnosti gljiva na sjemenu poljskoga jasena

Nakon obavljenoga postupka izolacije micelija na MEA hranjivoj podlozi, otkrivena je prisutnost gljiva u omjerima od 25 – 50 % od ukupnoga broja proučavanih sjemenki. U *tablici 4* može se uočiti kako je najveći postotak razvijenih gljiva na sjemenu otkriven na sjemenu jasena sakupljanoga na području šumarije Vukovar (58 %), dok je najmanji postotak od svega 25 % prisutnosti gljiva na sjemenu bio s lokacija šumarija Novoselec i Županja.

Tablica 4. Udio sjemena u kojem su se razvile gljive izolacijom na MEA hranjivu podlogu.

Lokacija	**Udio sjemena u kojem su potvrđene gljive izolacijom na MEA hranjivu podlogu**
Gunja	50 %
Lipovljani	50 %
Novoselec	25 %
Vukovar	58 %
Županja	25 %

Izolacijom micelija iz 25 sjemena od ukupno 60 proučavanih, razvilo se 30 micelija za koje je daljnjim analizama otkriveno da pripadaju u 15 različitih taksonomskih jedinca, od kojih je 10 uspješno identificirano do razine vrste. Na *slici 11* uočava se kako se od 30 razvijenih micelija najviše njih razvilo na sjemenu sakupljenom u šumariji Vinkovci (30 %), dok je najmanje razvijenih micelija bilo sa sjemena s lokacija Novoselec i Županja (10 %). Svi uzorci poslani na identifikaciju prikazani su u *tablici 5*, gdje naziv uzorka označava lokaciju (početno slovo lokacije) i broj sjemena s kojega se razvio micelij. Rezultati ovoga dijela istraživanja sortirani po otkrivenim taksonima u *tablici 6*, gdje se točno mogu vidjeti postoci zastupljenosti pronađenih gljiva u cjelokupnom proučavanom sjemenu. Na *tablici 7* pregledno je prikazan popis pronađenih taksona za svaku pojedinu lokaciju.



Slika 11. Grafički prikaz raspodjele razvijenih micelija po lokacijama.

Prema dobivenim rezultatima vidi se kako je najviše zastupljen rod bio rod *Alternaria* s postotkom pojavljivanja u svim uzorcima od 13,3 %. Rod *Alternaria* razvio se na sjemenu sa svih 5 lokacija. Ako bi se rezultati proučili na razini vrste, onda prednjači gljiva *Sphaerulina berberidis* (Niessl) Quaedvl., Verkley & Crous (6,6 %) te gljiva *Alternaria tenuissima* (Kunze) Wiltshire (3,3 %). Svi drugi otkriveni rodovi i vrste javljaju se u podjednakom postotku od 1,6 %. Vrsta *Sphaerulina berberidis* razvila se na sjemenu sa svih lokacija osim one u Vukovaru. Na nijednome uzorku nije utvrđena prisutnost gljive *Hymenoscyphus fraxineus.*

Tablica 5. Rezultati analize svih uzoraka.

Oznaka uzorka	Takson najveće podudarnosti prema BLAST algoritmu	Identifikacijski broj podudarajuće sekvence u NCBI GenBank	Podudarnost sekvenci
G4	*Alternaria* sp.	KX110398.1	99
G4b	*Alternaria tenuissima*	HG798721.1	100
G5	*Alternaria tenuissima*	MF072676.1	100
G8	*Sphaerulina berberidis*	LC206682.1	99
G10	*Cladosporium sphaerospermum/cucumerinum*	KU926349.1/KT898639.1	99
G10b	*Cladosporium sphaerospermum/cucumerinum*	KU926349.1/KT898639.1	100
L1	*Fusarium oxysporum*	MF993096.1	100
L3	*Lophiostoma* sp.	KR909174.1	99

L4	*Colletotrichum* sp.	KJ921883.1	100
L8	*Diaporthe melonis*	JN032733.1	100
L8b	*Diaporthe eres/melonis*	KR909214.1/JN032733.1	100
L12	*Alternaria* sp.	LT821417.1	99
N5	*Cladosporium cladosporioides*	KT898746.1	100
N7	*Diaporthe eres*	KU736950.1	100
N9	*Cercospora beticola*	KF251146.1	100
V1	*Alternaria* sp.	KY977546.1	100
V2	*Alternaria alternata/tenuissima/brassicae*	MF141012.1/KY400094.1/KT192210.1	100
V3	*Alternaria* sp.	KY977546.1	100
V3b	*Diplodia mutila*	KX618488.1	99
V6	*Cladosporium* sp.	LN808865.1	99
V6b	*Cladosporium herbarum*	LT603046.1	99
V8	*Penicillium brevicompactum/kongii*	KY859381.1/NR_138336.1	99
Ž1	*Alternaria* sp.	KP217186.1	100
Ž7	*Venturia fraxini*	KF793775.1	99

Tablica 6. Rezultati istraživanja grupirani po taksonima.

Identificirani taksoni pronađenih gljiva prema NCBI GenBank bazi podataka	**Identifikacijski broj sekvence u NCBI GenBank bazi**	**Udio sjemena poljskoga jasena na kojem je gljiva prisutna**
Alternaria sp.	MH137756	13,3 %
Alternaria tenuissima (Kunze) Wiltshire	MH137745 MH137746	3,3 %
Cercospora beticola Sacc.	MH137755	1,6 %
Cladosporium cladosporioides (Fresen.) G.A. de Vries	MH137753	1,6 %
Cladosporium herbarum (Pers.) Link	MH137759	1,6 %
Cladosporium sp.	MH137748	1,6 %
Colletotrichum sp.	MH137751	1,6 %
Phomopsis velata (Sacc.) Traverso	MH137754	1,6 %
Phomopsis cucurbitae McKeen 1957	MH137752	1,6 %
Botryosphaeria stevensii Shoemaker	MH137758	1,6 %
Fusarium oxysporum Schltdl.	MH137749	1,6 %
Lophiostoma sp.	MH137750	1,6 %
Penicillium sp.	MH137760	1,6 %
Sphaerulina berberidis (Niessl) Quaedvl., Verkley & Crous	MH137747	6,6 %
Venturia fraxini Aderh.	MH137761	1,6 %

Tablica 7. Pregled otkrivenih taksona za svaku lokaciju.

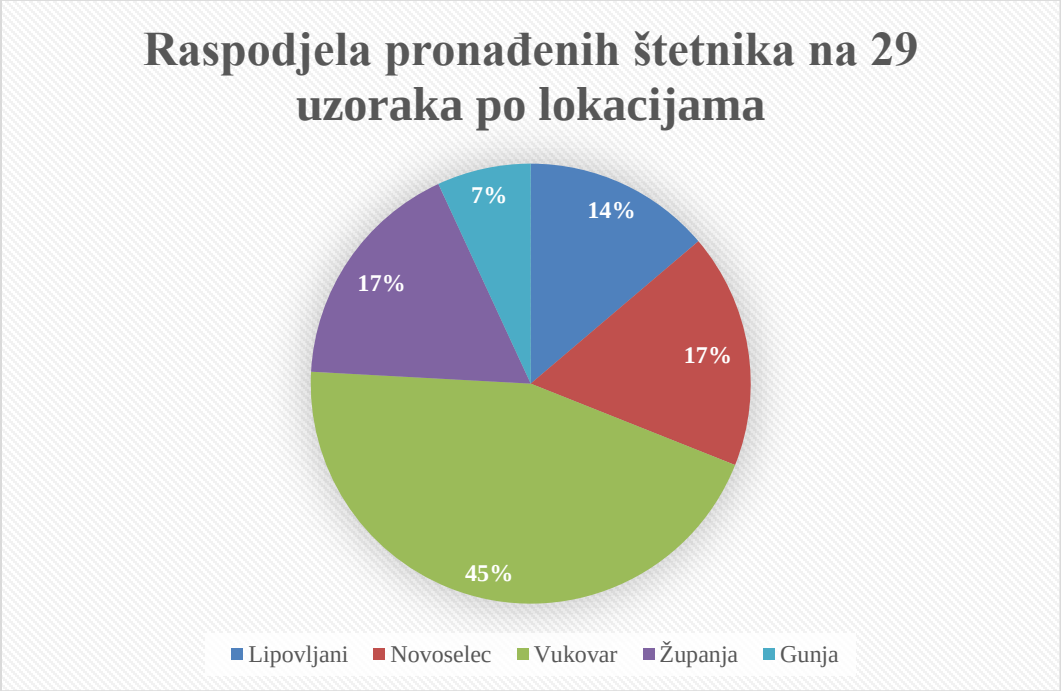
Lokacija	Sjemenka	Identificirani takson gljive prema NCBI GenBank bazi
Gunja	S4	*Alternaria tenuissima*
	S5	*Alternaria tenuissima*
	S8	*Sphaerulina berberidis*
	S9	*Sphaerulina berberidis*
	S10	*Cladosporium* sp.
	S12	*Sphaerulina berberidis*
Lipovljani	S1	*Fusarium oxysporum*
	S3	*Lophiostoma* sp.
	S4	*Colletotrichum* sp.
	S8	*Diaporthe melonis*
	S11	*Alternaria* sp.
	S12	*Alternaria* sp.
Novoselec	S5	*Cladosporium cladosporioides*
	S7	*Diaporthe eres*
	S9	*Cercospora beticola*
Vukovar	S1	*Alternaria* sp.
	S2	*Alternaria* sp.
	S3 a)	*Alternaria* sp.
	S3 b)	*Botryosphaeria stevensii*
	S6	*Cladosporium* sp.
	S8	*Penicillium* sp.
	S11	*Alternaria* sp.
	S12	*Alternaria* sp.
Županja	S1	*Alternaria* sp.
	S3	*Sphaerulina berberidis*
	S7	*Venturia fraxini*

3.2. Rezultati istraživanja prisutnosti štetnika na sjemenu poljskoga jasena

Prisutnost štetnika na sjemenu poljskoga jasena utvrđena je na ukupno 29 sjemenki (*slika 12*). Analizom je otkriveno kako su se udjeli prisutnosti kretali na svakoj pojedinoj lokaciji od 2 do 13 %, gdje je najmanji postotak štetnika bio s lokacije Gunja (2 %), a najveći na lokaciji Vukovar (13 %). Postoci utvrđenih štetnika prikazani su na *tablici 8.* Analizom svih odvojenih uzoraka potvrđena je prisutnost dviju vrsta kukaca: jedan je jasenova pipa roda *Lignyodes*, koja je štetnik na sjemenu jasena, a drugi je parazitoidna osa na jasenovoj pipi iz porodice *Chalcididae*. Jasenova pipa pronađena je u stadiju ličinke, dok je parazitoidna osa pronađena u stadiju ličinke i imaga.

Tablica 8. Udjeli utvrđenih štetnika po lokacijama.

Lokacija	Udio sjemena napadnutog štetnicima	Udio šturog sjemena
Gunja	2 %	8 %
Lipovljani	4 %	–
Novoselec	5 %	–
Vukovar	13 %	10 %
Županja	5 %	–



Slika 12. Raspodjela napadnutih sjemenki po lokacijama.

4. Rasprava

Kao što je prikazano u rezultatima, na 42 % proučavanoga sjemena poljskoga jasena razvilo se ukupno 15 različitih taksona gljiva, što pokazuje relativno dobro zdravstveno stanje sjemena u usporedbi s prethodnim istraživanjima na običnome jasenu (*Fraxinus excelsior* L.), u kojima je dokazano puno više prisutnih taksona gljiva s većim postocima zaraženoga sjemena (Cleary et al. 2013, Hayatgheibi 2013). Svo proučavano sjeme prije stavljanja na hranjive podloge izgledalo je potpuno zdravo te nije pokazivalo nikakve vidljive degradacije, trulež ili nekroze. Također je utvrđen relativno malen postotak napadnutoga sjemena štetnicima (5,8 %).

Može se primijetiti kako je sjeme sakupljeno u šumariji Vukovar imalo najveći postotak razvijenih gljiva (58 %), ali i najveći postotak napadnutosti štetnicima (13 %). Sakupljanjem uzoraka za analizu štetnika ustanovljeno je da je 10 % sjemena s te lokacije bilo šturo. Vizualnom inspekcijom također je zamijećeno da sjeme iz šumarije Vukovar prosječno ima i manje dimenzije od sjemena s drugih lokacija. Sjeme sakupljeno u šumarijama Novoselec i Županja pokazuje podjednako zdravstveno stanje s najnižim postotkom razvijenih micelija (10 %) i relativno niskim udjelom štetnika (5 %). Šumarije Gunja i Lipovljani imali su razmjerno visok postotak razvijenih micelija te vrlo nizak postotak napadnutosti štetnicima.

4.1. Gljive pronađene u sjemenu poljskoga jasena

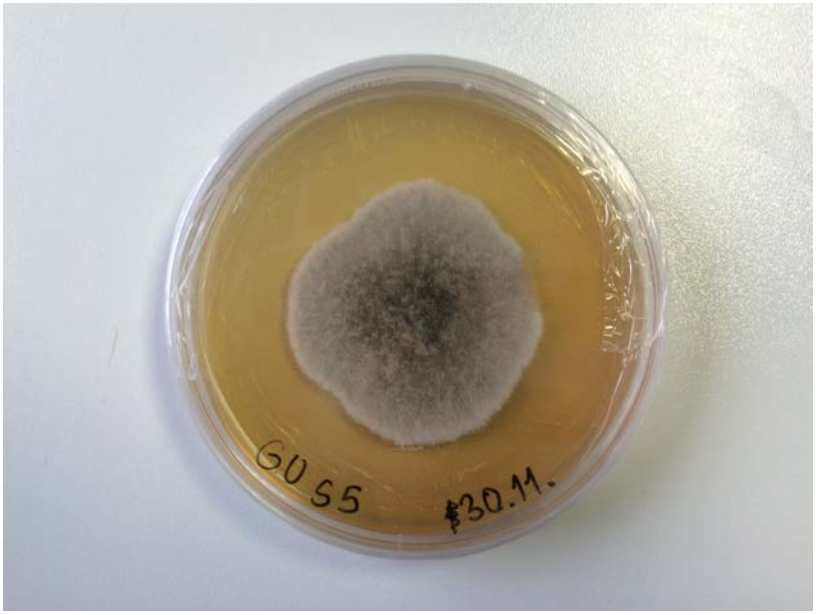
4.1.1. Rod *Alternaria*

U rezultatima se primjećuje kako je najzastupljeniji rod u sjemenu jasena bio rod *Alternaria* s postotkom prisutnosti od 13,3 %. Kako navodi Thomma (2003), vrste roda *Alternaria* pretežno su saprotrofske gljive, no neke su vrste razvile patogena svojstva, uzrokujući bolesti na širokome spektru domaćina. Vrste roda *Alternaria* s patogenim svojstvima oportunistički su patogeni jer napadaju fiziološki oslabjele jedinke. Najviše se javljaju na poljoprivrednim kulturama na kojima rade najveće štete. Za vrste *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. i *Alternaria tenuissima* (Kunze) Wiltshire dokazano je kako se pojavljuju kao patogeni na sjemenu vrsta roda *Betula* i na običnome bagremu (*Robinia pseudoaccacia* L.) (Sunita 1998) te kao uzročnici truleži plodova pri skladištenju za vrste roda *Malus* i za nar (*Punica granatum* L.) (Zambounis i sur. 2015). Vrsta *A. alternata* također je otkrivena na odumirućim jedinkama vrste *Fraxinus excelsior* (Kowalski i sur. 2016) u zaraženim dijelovima kore, drva i u pupovima. To upućuje na mogućnost da se ova vrsta javlja kao oportunistički patogen u odumirućim dijelovima jasena te moguće i na samom sjemenu jasena ako

bi se pojavili negativni biotski i abiotski utjecaji. Vrste roda *Alternaria* vrlo su varijabilne i unutar vrste (Thomma 2003), stoga je vrlo teško čak i DNK analizama točno odrediti vrstu. U ovome je istraživanju do razine vrste otkrivena *Alternaria tenuissima* (Kunze) Wiltshire s postotkom učestalosti od 3,3 %. Razvijeni miceliji ovoga roda prikazani su na *slikama 13* i *14*.



Slika 13. Miceliji taksona *Alternaria* sp. (Vukovar).



Slika 14. Micelij vrste *Alternaria tenuissima.*

4.1.2. *Sphaerulina berberidis* (Niessl) Quaedvl., Verkley & Crous

Najzastupljenija takson gljive identificiran do razine vrste na sjemenu jasena u ovome istraživanju je gljiva *Sphaerulina berberidis* (Niessl) Quaedvl., Verkley & Crous (*slika 15)* s postotkom učestalosti pojavljivanja od 6,6 %. U dosadašnjim istraživanjima ova je gljiva utvrđena samo kao endofit u lišću nekoliko vrsta drveća (Eo i sur. 2014) te je velika vjerojatnost da ima i takvu ulogu u sjemenu jasena, budući da nije uzrokovala nikakve vidljive simptome na proučavanome sjemenu. U sličnim istraživanjima prisutnost gljiva na sjemenu običnoga jasena (*Fraxinus excelsior*) *S. berberidis* nije utvrđena (Hayatgheibi 2013, Cleary i sur. 2012).

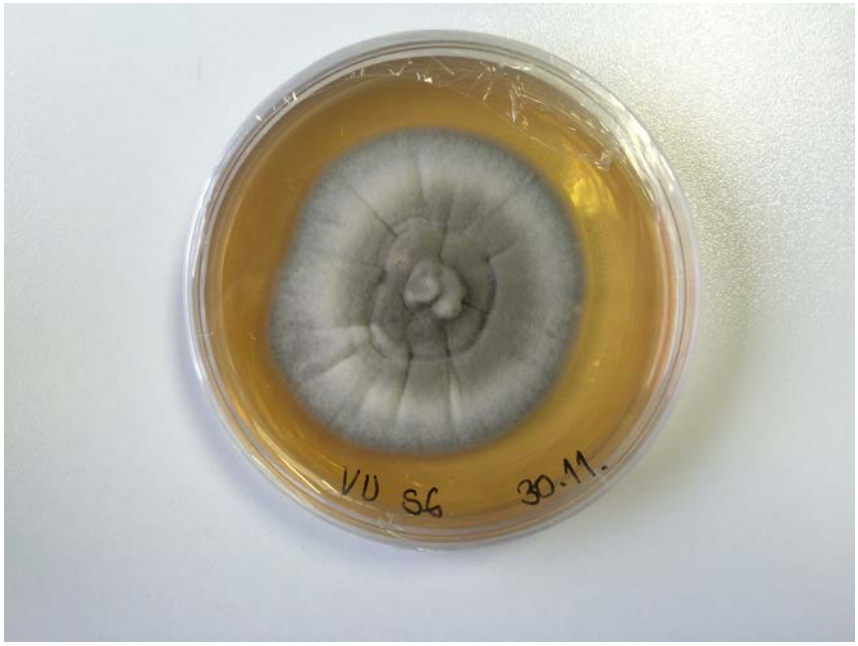


Slika 15. Micelij vrste *Sphaerulina berberidis* (Gunja).

4.1.3. Ostali taksoni gljiva u sjemenu jasena

Svi drugi taksoni gljiva pojavljivali su se u sjemenu jasena s učestalosti od 1,6 %.

Cladosporium (*slika 16*) je rod gljiva koji uključuje razne vrste plijesni. Mnoge se vrste ovoga roda mogu često naći i na živome i na mrtvome biljnome materijalu. Neke su vrste patogeni bilja dok su druge paraziti na drugim gljivama. Dobro se razvijaju u uvjetima visoke vlage. Smatra se da u ovome rodu postoji više od 700 vrsta (Dugan i sur. 2004). U ovome su istraživanju determinirane dvije vrste iz ovoga roda: *Cladosporium herbarum* (Pers.) (*slika 18*) Link (slika) i *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries (*slika 17*). *C. herbarum* uzročnik je propadanja sadnica vrste *Astragalus adsurgens* Pall. te bolesti lišća vrste *Centaurea solstitialis* L. u Grčkoj (Berner 2007). Također je uzročnik bolesti drugih kultura (pšenica, suncokret) i bolesti lišća vrste *Prunus tomentosa* Thunb. (Ram 1974). Za ovu je vrstu zabilježeno kako uzrokuje i propadanje plodova vrsta iz roda *Prunus* (Tonini 1996). Vrsta *C. cladosporoides* kozmopolitska je vrsta koja je prvenstveno poznata kao saprotrof u odumirućem tkivu (Bensch i sur. 2010), ali isto tako učestalo dolazi kao endofit u zdravome tkivu na više vrsta drveća, uključujući i jasen (Kowalski i sur. 2016, Haňáčková i sur. 2017). Otkriveno je kako ova gljiva uzrokuje bolesti sjemena duhana *(Nicotiana tabacum* L.) u Kini (Wang i sur. 2014), bolesti lišća papaje (*Carica papaya* L.) na Tajvanu (Chen i sur. 2009), bolesti lišća jagode (*Fragaria* spp.) u SAD-u (Gubler 1999) te pridolazi kao patogen skladištenih lješnjaka (*Corylus avellana* L.) u Iranu (Moghaddam 2007).



Slika 16. Micelij taksona *Cladosporium* sp.



Slika 18. Micelij vrste *Cladosporium herbarum.*



Slika 17. Micelij vrste *Cladosporium cladosporioides.*

Pronađene su i dvije gljive koje su poznati patogeni na šumskome drveću, a to su *Phomopsis velata* (Sacc.) Traverso (sinonim *Diaporthe eres*) (*slika 19*) i *Botryosphaeria stevensii* Shoemaker (sinonim *Diplodia mutila*) i obje su utvrđene i na sjemenu običnoga jasena u istraživanjima u Švedskoj i Latviji (Cleary i sur. 2013). *P. velata* poznata je po tome što uzrokuje rak debla na nekoliko vrsta šumskoga drveća (Anagnostakis 2007), trulež plodova dunje (*Cydonia oblonga* Mill.) (Ristić i sur. 2016) i propadanje sjemena soje u Srbiji (Petrović 2015). Također je otkrivena u nekrotičnome tkivu vrste *Fraxinus excelsior* (Kowalski i sur. 2016, Langer 2017). S druge stane, vrsta *Botryosphaeria stevensii* poznata je kao parazit odgovoran za odumiranje kore, uzrokovanje rakastih tvorevina i odumiranje vrsta *Fraxinus excelsior* i *Fraxinus ornus* L., vrste roda *Quercus* te ostalih vrsta drveća (Sidoti i Granata 2004, Sims i sur. 2016).



Slika 19. Micelij taksona *Diaporthe* sp. (Lipovljani).

Vrsta *Phomopsis cucurbitae* McKeen 1957 (sinonim *Diaporthe melonis*) potvrđeni je uzročnik bolesti plodova lubenice, avokada i krastavca (Gomes i sur. 2013).

Neke pronađene vrste potvrđene su kao patogeni sjemena i plodova na drugim vrstama drveća kao što je vrsta *Fusarium oxysporum* Schltdl. utvrđena na sjemenu običnoga bagrema (*Robinia pseudoacacia* L.) (Sunita 1999). Gljive iz roda *Fusarium* (*slika 20*) u prvom su redu poznate kao uzročnici polijeganja ponika, a zatim kao patogeni šumskoga sjemena. Za ove je gljive karakteristično da na napadnutim plodovima i sjemenu tvore navlake micelija s konidijama u obliku sitnih jastučića. Boja micelija ovisi o vrsti. Važno je naglasiti kako ovaj patogen prelazi na klice i mlade biljke iz sjemena i na taj način uzrokuje polijeganje ponika (Glavaš 1999).



Slika 20. Micelij vrste *Fusarium oxysporum.*

Gljive iz roda *Penicillium* (*slika 22*) najčešće su gljive u prirodi. Prema Glavašu (1999) vrste ovoga roda dolaze na svim biljnim vrstama, a javljaju se na odumirućim biljnim dijelovima, ali i na živome tkivu na mjestima mehaničkih ozljeda. Većina tih gljiva su saprotrofi. Za sve vrste iz roda *Penicillium* koje dolaze na sjeme zajedničko je to što u sjemenu smanjuju sadržaj vode do čak 25 % te na taj način značajno smanjuju ili u potpunosti uništavaju klijavost sjemena.

Vrsta *Venturia fraxini* Aderh.(*slika 21*) obično je poznata kao endofit u jasenovu lišću (Schlegel 2016) i u ostalome zdravome tkivu, no nađena je također u simptomatičnome tkivu običnoga jasena u Ukrajini (Davydenko i sur. 2013) te u nekrotičnome tkivu lišća, peteljki i kore izbojaka običnoga jasena (Bakys i sur. 2009). U sjemenu jasena do sada još nije utvrđena.



S**lika 22**. Micelij taksona *Penicillium* (Vukovar).



Slika 21. Micelij vrste *Venturia fraxini* (Županja)

4.1.4. Izostanak gljive *Hymenoscyphus fraxineus* u sjemenu

U ovome istraživanju patogen *Hymenoscyphus fraxineus* nije pronađen ni u jednome sjemenu poljskoga jasena, što opovrgava pretpostavku ovoga istraživanja da se taj patogen proširio na mlade sadnice iz sjemena i na taj ih način zarazio. Neobično je što se u srodnim istraživanjima vršenim na sjemenu običnoga jasena (Cleary i sur. 2013, Hayatgheibi 2013, Marčiulynienė i sur. 2018) potvrdila prisutnost ove gljive na sjemenu koje je sakupljano sa zaraženih stabala, ali i sa vizualno zdravih stabala. Postoji više mogućih razloga zašto u ovome istraživanju gljiva *Hymenoscyphus fraxineus* nije pronađena u sjemenu te zašto su mlade sadnice bile zaražene. Moguće je da je samo vrijeme sakupljanja sjemena imalo utjecaja na prisutnost toga patogena u sjemenu jer su 2017. godine ljetni vremenski uvjeti bili izuzetno topli, a vjerojatno je da su visoke temperature ograničavajući čimbenik za širenje te gljive (Hauptman i sur. 2013). Također se u ovome istraživanju koristila površinska sterilizacija sjemena kao početni korak kako bi se istraživanje usmjerilo na gljive unutar sjemena, što je vjerojatno uništilo eventualne spore *Hymenoscyphus fraxineus* na površini sjemena. Primijećeno je i kako se miceliji *Hymenoscyphus fraxineus* vrlo sporo razvijaju i slabo su konkurentni (Milotić 2017) te je moguće da su ih miceliji brže rastućih gljiva prerasli pa ih nije bilo moguće detektirati i presaditi u zasebne Petrijeve zdjelice

za daljnju analizu. Najvjerojatnije objašnjenje za zarazu mladih sadnica u šumariji Vukovar je da su mlade sadnice ipak zaražene s okolnih stabala.

4.2. Štetnici pronađeni u sjemenu jasena

Proučavajući prisutnost štetnika na sjemenu poljskoga jasena, pronađene su dvije vrste kukaca. Jedan je pipa na sjemenu jasena roda *Lygniodes*, koja se u stadiju ličinke hrani sjemenom i time pripada u skupinu šumskih štetnika. Na proučavanim uzorcima pronađena je u stadiju ličinke (*slika 23* i *24*). Druga vrsta kukaca pripada parazitskoj osici na pipi iz porodice *Chalcididae* od koje su pronađeni i stadij ličinke i stadij imaga. Ukupni dobiveni postotak napadnutosti sjemena jasena štetnicima relativno je nizak te iznosi 5,8 % (29 napadnutih sjemenki od ukupno 500 promatranih). U ovome radu prvi se puta spominje prisustvo štetnika iz roda *Lygniodes* na sjemenu poljskoga jasena u Hrvatskoj.



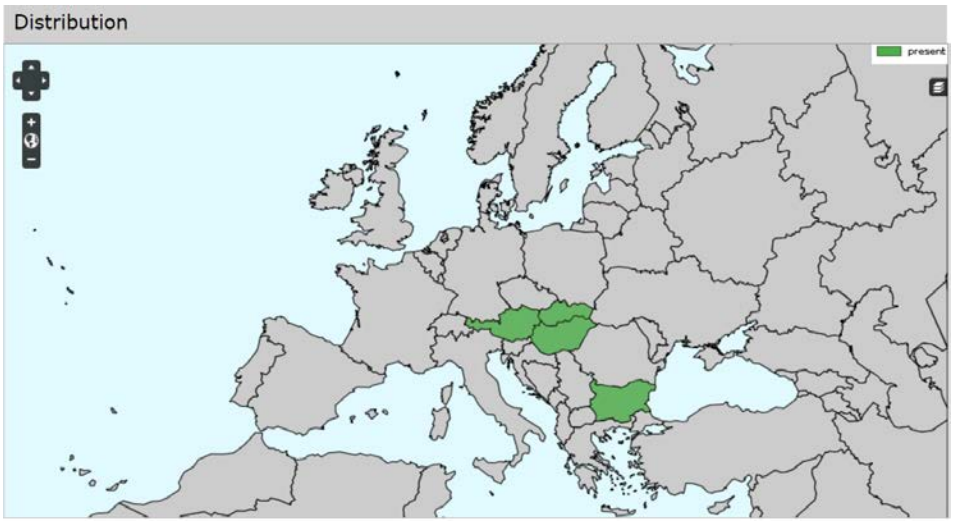
Slika 24. Ličinka iz porodice *Lygniodes.*



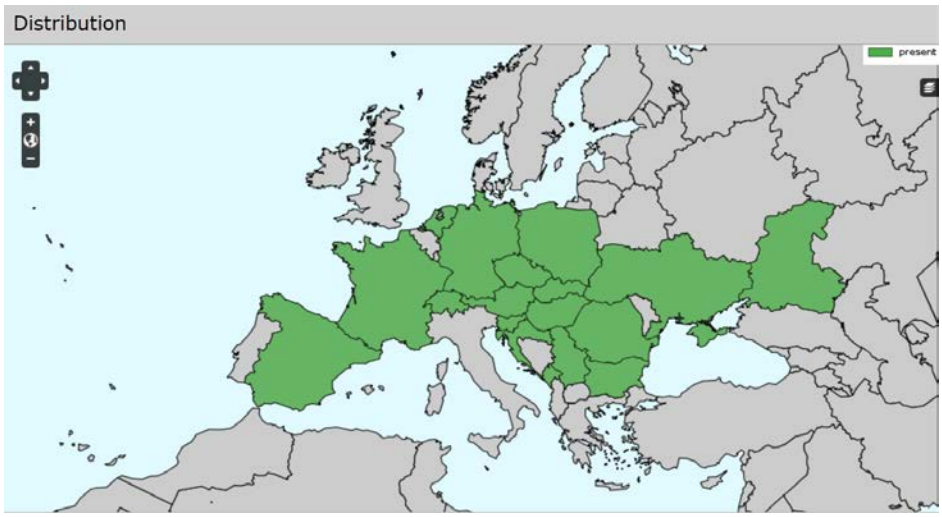
Slika 23. Ličinka iz porodice *Lygniodes.*

4.2.1. Rod Lignyodes

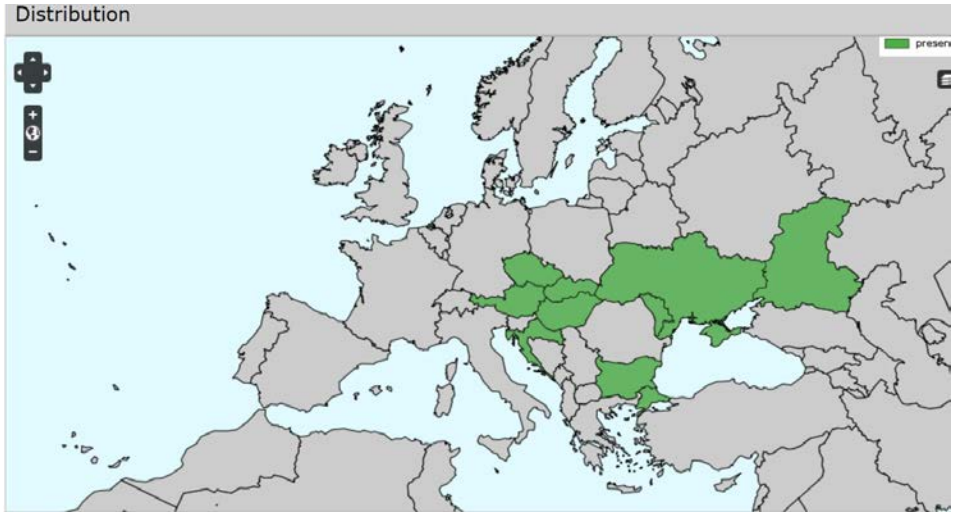
Na internetskoj stranici *Fauna Europaea* (https://fauna-eu.org/) navedene su tri vrste iz roda *Lignyodes* pronađene u Europi: *Lignyodes bischoffi* (Blatchley, 1916) (sinonim *Thysanocnemis bischoffi* Blatchley, 1916) koja je originalno vrsta iz Sjeverne Amerike unesena u Europu, *Lignyodes enucleator* (Panzer, 1798) (sinonim *Curculio enucleator* Panzer, 1798) te vrsta *Lignyodes suturatus* (Fairmaire, 1859) (sinonimi: *Lignyodes muerlei* Ferrari, 1866 i *Lignyodes uniformis* Desbrochers, 1894). Potvrđena područja rasprostranjenosti navedenih vrsta u Europi prikazana su na *slikama 25, 26* i *27*.



Slika 25. Područje rasprostranjenosti *Lignyodes bischoffi.*



Slika 26. Područje rasprostranjenosti *Lignyodes enucleator.*

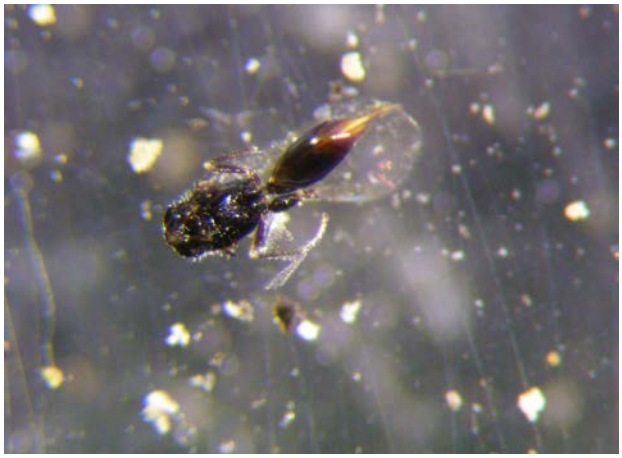


Slika 27. Područje rasprostranjenosti *Lignyodes suturatus.*

Prema Arzanovu (2013) vrsta *Lygniodes bischoffi* (Blatchley, 1916) prvi je put otkrivena u Europi 1960. godine u Slovačkoj te je postepeno otkrivena i u Austriji, Švicarskoj, Mađarskoj, Bugarskoj, Moldaviji te u istočnoj Ukrajini. Autor navodi kako prema Porasu (1991) ova vrsta štetnika prvenstveno napada američke vrste jasena, posebice *Fraxinus pennsylvanica* Marshall, dok europske vrste jasena napada znatno rjeđe. Pretpostavlja se kako je najvažniji razlog tomu što se razvoj ličinke odvija u sjemenu jasena, koje je kod američkih vrsta jasena oblo, a kod europskih vrsta jasena plosnato, što sprječava potpuni razvoj ličinke te zaustavlja njen daljnji razvoj, stoga ovaj štetnik u Europi predstavlja veći problem za nasade američkih vrsta jasena te u proizvodnji ukrasnoga bilja nego što za autohtono šumsko drveće.

4.2.2. Parazitoidna osa

Pronađena parazitoidna osa iz porodice *Chalcididae* prirodni je neprijatelj šumskim štetnicima jer se hrani njihovim ličinkama te zato ima važnu ulogu u prirodnom suzbijanju štetnika. Najvažnije morfološko obilježje ovih osa je „utezanje abdominalnih segmenata na spoju s prsištem (tzv. „drškasti“ abdomen)“ (Hrašovec i Franjević 2011), što se može jasno vidjeti na *slici 28*. Prema Hrašovcu i Franjeviću (2011), tijelo ovih osa obično je svjetlije ili tamnije boje raznih nijansi, ali najčešće s metalnim preljevom, dok je krilna nervatura znatno reducirana. Pripadnici ove porodice uglavnom su zoofagni endoparaziti kao što je i slučaj kod pronađene osice. Ličinke su apodne i acefalne (*slika 29*). Moglo bi se pretpostaviti kako ova parazitoidna osica pripada rodu *Paracrias* koji ima 64 različitih vrsta, većinom parazitoida na ličinkama kornjaša, od kojih su neke specijalizirane baš za pipe (porodica *Curculionidae*) (Palmieri i sur. 2013).



Slika 28. Parazitoidna osica.



Slika 29. Apodna acefalna ličinka.

Obje vrste pronađene entomofaune slabo su proučavane te je za sada bez daljnjih detaljnijih istraživanja teško determinirati primjerke do razine vrste i odrediti njihovu ulogu i važnost za sjeme jasena te za šumske ekosustave općenito.

5. Zaključak

U ovome je radu provedeno istraživanje zdravstvenoga stanja sjemena poljskoga jasena sakupljenog s vizualno zdravih stabala kako bi se dobile smjernice za buduće razmnožavanje poljskoga jasena. Primarni cilj istraživanja bio je utvrditi prisutnost patogene gljive *Hymenoscyphus fraxineus* kao mogućeg razloga odumiranja mladih sadnica zaraženih tom gljivom. Odumiranje mladih sadnica zabilježeno je na području šumarije Vinkovci, gdje nije utvrđena prisutnost gljive *Hymenoscyphus fraxineus* na okolnim stablima. Taj je slučaj motivirao ovo istraživanje.

Provedenom analizom sjemena poljskoga jasena dobiven je relativno nizak postotak zaraze sjemena gljivama (42 %) u usporedbi s drugim istraživanjima na jasenu, kao i vrlo mali postotak napadnutosti štetnicima (5,8 %). Svo sjeme koje se proučavalo u ovome istraživanju nije pokazivalo nikakve vidljive simptome zaraza gljivama, što dokazuje kako identificirane vrste i rodovi gljiva nisu prouzročile propadanje sjemena nakon nekoliko mjeseci skladištenja, iako su neke od njih potvrđene kao patogeni sjemena i oportunistički patogeni na nekrotiziranome tkivu jasena, što znači da bi produljenjem vremena skladištenja ili skladištenjem u uvjetima povišene vlage lako mogle prouzrokovati jače propadanje sjemena. Na sjemenu napadnutom štetnicima bile su vidljive promjene u zdravstvenome stanju, kao što su razna oštećenja, vidljivo smanjenje vitaliteta i šupljine uzrokovane hranjenjem ličinki pipe, ali također na manjem broju sjemena, što ukazuje na relativno dobro zdravstveno stanje i s ovog aspekta istraživanja.

Prisutnost patogene gljive *Hymenoscyphus fraxineus* nije potvrđena ni na jednome sjemenu, stoga se može zaključiti kako zaraza koja je uzrokovala odumiranje mladih sadnica na području UŠP Vinkovci sigurno nije došla sa sjemena, već nekim vanjskim putem, najvjerojatnije s okolnih stabala.

6. Popis literature

Allemann, C., P. Hoegger, U. Heiniger i D. Rigling (1999) Genetic variation of *Cryphonectria* hypoviruses (CHV1) in Europe, assessed using restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers, *Molecular Ecology*, 8 (5): 843–854.

Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers i D. J. Lipman (1990) Basic local alignment search tool, *Journal of Molecular Biology*, 215 (3): 403–10.

Anagnostakis, S. L. (2007) *Diaporthe eres* (*Phomopsis oblonga*) as a pathogen of butternut (*Juglans cinerea*) in Connecticut, *Plant Disease*, 91 (9): 1198–1198.

Arzanov, Yu. G. (2013) *Lignyodes bischoffi* Blatchley, 1916 (Curculionidae)—A New Species of Invasive Weevils for Russia, Russian Journal of Biological Invasion, 4 (4): 209–211. IZvorno objavljeno u časopisu: *Rossiiskii Zhurnal Biologicheskikh Invasii*, 2013, 3: 2–6.

Bakys, R., A. Vasiliauskas, K. Ihrmark, J. Stenlid, A. Menkis i R. Vasaitis (2011) Root rot, associated fungi and their impact on health condition of declining *Fraxinus excelsior* stands in Lithuania, *Scandinavian Journal of Forest Research*, 26 (2): 128–135.

Bakys, R., R. Vasaitis, P. Barklund, K. Ihrmark i J. Stenlid (2009) Investigations concerning the role of *Chalara fraxinea* in declining *Fraxinus excelsior*, *Plant Pathology*, 58: 284–292.

Bensch, K., Groenewald, J. Z., Dijksterhuis, J., Starink-Willemse, M., Andersen, B., Summerell, B. A., Shin, H.-D., Dugan, F.M., Schroers, H.-J., Braun., U., Crous, P. W. (2010) Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (Davidiellaceae, Capnodiales). *Studies in Mycology*, 67: 1–94.

Berner, D. K., E. L. Smallwood, M. B. McMahon, D. G. Luster (2007) First Report of Leaf Spot Caused by *Cladosporium herbarum* on *Centaurea solstitialis* in Greece, *Plant Disease*, 91 (4): 463.

Chandelier, A., F. Gerarts, G. San Martin, M. Herman i L. Delahaye (2016) Temporal evolution of collar lesions associated with ash dieback and the occurrence of *Armillaria* in Belgian forests, *Forest Pathology*, 46 (4): 289–297.

Chen, H. M., Wang, P. Y., Tsai, S.W. (2009) Carica papaya lipase-catalyzed transesterification resolution of secondary alcohols in organic solvents, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers,* 40(5): 549–554.

Cleary M. R., N. Arhipova, T. Gaitnieks, J. Stenlid i R. Vasaitis (2013) Natural infection of *Fraxinus excelsior* seeds by *Chalara fraxinea*, *Forest Pathology*, 43 (1): 83–85.

Davydenko, K., R. Vasaitis, J. Stenlid, A. Menkis (2013) Fungi in foliage and shoots of *Fraxinus excelsior* in eastern Ukraine: a first report on *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, *Forest Pathology*, 43 (6): 462-467.

Diminić D. (2015) Nova bolest jasena (*Fraxinus* spp.) u Hrvatskoj, U: S. Matić, F. Tomić i I. Anić (ed), *Proizvodnja hrane i šumarstvo - temelj razvoja istočne Hrvatske,* Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti (HAZU), 363–373.

Draghici, C. i I. V. Abrudan (2011) The Effect of Different Stratification Conditions on the Germination of *Fraxinus angustifolia* Vahl. and *F. ornus L.* Seeds, *Not Bot Hort Agrobot Cluj*, 39 (1): 283–287.

Drvodelić, D. i Oršanić M. (2016) Procjena vitalnosti svježeg i preležanog sjemena poljskog jasena *(Fraxinus angustifolia* Vahl*), Šumarski list*, (11–12): 539–547, Zagreb.

Dugan, F. M., Schubert, K., Braun, U. (2004) Check-list of Cladosporium names), *Schlechtendalia*, 11: 1–119.

Eo, J.-K., B.-H. Lee, A.-H. Eom (2014) Four Species of Endophytic Fungi Isolated from Leaves of Woody Plants in Mt. Hambaek, *The Korean Journal of Mycology*, 42 (3): 239–242.

Franjić, J., Ž. Škvorc (2010) *Šumsko drveće i grmlje Hrvatske.* Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, Zagreb.

G. E. Harman, A. L. Granett and G. Nash (1972) Seed deterioration by storage fungi, *New York's Food and Life Sciences Quarterly*, 5 (2): 19–22.

Glavaš M. (1999) *Gljivične bolesti šumskog drveća*, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Gomes R. R., Glienke C., Videira S. I. R., Lombard L., Groenewald J. Z., Crous P. W. (2013) *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia* 31: 1–41.

Gross, A., O. Holdenrieder, M. Pautasso, V. Queloz i T. N. Sieber (2014) *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the causal agent of European ash dieback, *Molecular Plant Pathology*, 15 (1): 5-21.

Hall, T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95–98.

Haňáčková, Z., Havardova L., Černy K., Zahradnik D., Koukol O. (2017) Fungal Endophytes in Ash Shoots – Diversity and Inhibition of *Hymenoscyphus fraxineus*, *Baltic Forestry*, 23 (1): 89–106.

Hauptman, T., B. Piškur, M. Groot, N. Ogris, M. Ferlan, D. Jurc, O. Holdenrieder (2013) Temperature effect on *Chalara fraxinea*: heat treatment of saplings as a possible disease control method, *Forest Pathology*, 43 (5): 360–370.

Hayatgheibi H. (2013) Studies on the microflora associated with the seeds of European ash (*Fraxinus excelsior*) and the infection biology of the pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus* causing ash dieback, Swedish University of Agriculture Science.

Hrašovec, B., M. Franjević (2011) *Primijenjena entomologija*, Skripta, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Idžojtić, M. (2013) *Dendrologija. Cvijet, češer, plod, sjeme*. Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, Zagreb.

Kowalski, T. (2006) *Chalara fraxinea* sp. nov. associated with dieback of ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland, *Forest Pathology*, 36 (4): 264–270.

Kowalski, T., W. Kraj and B. Bednarz (2016) Fungi on stems and twigs in initial and advanced stages of dieback of European ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland, *European Journal of Forest Research*, 135 (3): 565–579.

Kranjec, J. (2017) Uloga gljiva i gljivama sličnih organizama u odumiranju poljskoga jasena (*Fraxinus angustifolia* Vahl) u posavskim nizinskim šumama u Republici Hrvatskoj, Doktorska disertacija, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Kranjec, J., M. Milotić, M. Hegol i D. Diminić (2017) Gljivama slični organizmi u tlu odumirućih sastojina poljskog jasena (*Fraxinus angustifolia* Vahl), *Šumarski list*, (3-4): 115–122.

Langer, G. (2017) Collar rots in forests of Northwest Germany affected by ash dieback, *Baltic Forestry*, 23 (1): 4–19.

Marčiulynienė D., K. Davydenko, J. Stenlid, D. Shabunin i M. Cleary (2018) *Fraxinus excelsior* seed is not a probable introduction pathway for *Hymenoscyphus fraxineus*, *Forest Pathology*, 48 (1): e12392-n/a.

Matić, S., M. Oršanić, I. Anić (2005) Sjemenarstvo i rasadničarstvo najvažnijih vrsta drveća poplavnih šuma, *Poplavne šume u Hrvatskoj*, Akademija šumarskih znanosti, 277–297, Zagreb.

Milotić, M. (2017) Uloga gljive *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya u odumiranju jasena (*Fraxinus* spp.) u Republici Hrvatskoj, Doktorska disertacija, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Mittal R. i B. Wang, 1987: Fungi associated with seeds of eastern white pine and white spruce during cone processing and seed extraction, *Canadian Journal of Forest Research*, 17 (9): 1026–1034.

Palmieri, L., Farache, F. H. A., Pereira, R. A. S., Hansson, C. (2013) New records of *Paracrias* Ashmead (*Hymenoptera, Eulophidae*) as parasitoids on weevil larvae (*Coleoptera, Curculionidae*) in Brazil, with the description of a new species. *Iheringia*. Série Zool. 103, 313–317.

Potočić, N i sur. (2017) *Oštećenost šumskih ekosustava Republike Hrvatske*, Hrvatski šumarski institut, Jastrebarsko. [Digitalna datoteka]

Schlegel, M., V., L. Dubach, V. Buol, T. N. Sieber (2016) Effects of endophytic fungi on the ash dieback pathogen, *FEMS Microbiology Ecology*, 92 (9): 142–142.

Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Crous, P. W. (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.

Sidoti A. i G. Granata (2004) Manna ash (*Fraxinus ornus*): a new host of *Diplodia mutila*, *Informatore Fitopatologico*, 54 (2): 49–51.

Sims, L., D. Schmidt, M. Garbelotto, M. Uhler and J. Dahl (2016) First report of bristlecone fir branch canker in California caused by *Diplodia mutila*, *Plant Disease*, 100 (12): 2534–2534.

Sunita, S. (1998) Seed mycoflora of *Robinia pseudoacacia* Linn. and its control, *Indian Forester*, 124 (5): 347–350.

Thomma, B. P. H. J. (2003) Alternaria spp.: from general saprophyte to specific parasite, *Molecular plant Ptholoy*, 4 (4): 225–236.

Tonini, G. i M. Capriotti (1996) Postharvest damage to stone fruits and its prevention, *Informatore Agrario Supplemento*, 52 (15): 32–45.

Vukelić, J. (2012) *Šumska vegetacija Hrvatske*, Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb.

White, T. J., T. Bruns, S. Lee i J. W. Taylor (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, PCR protocols: A Guide to Methods and Applications, *Academic Press Inc*., 315–322.

Zambounis, A., A. Xanthopoulou, G. Karaoglanidis, A. Tsaftaris and P. Madesis (2015) A new accurate genotyping HRM method for *Alternaria* species related to fruit rot diseases of apple and pomegranate, *International Journal of Phytopathology*, 4 (3): 159–165.