

Mjere zaštite poljskog jasena od bolesti uzrokovane gljivom *Hymenoscyphus fraxineus*

Vajdić Dretar, Ivan

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:108:769164>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-25**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET ŠUMARSTVA I DRVNE TEHNOLOGIJE
ŠUMARSKI ODSJEK

PREDDIPLOMSKI STUDIJ ŠUMARSTVA

IVAN VAJDIĆ DRETAR

MJERE ZAŠTITE POLJSKOG JASENA OD BOLESTI UZROKOVANE
GLJIVOM *HYMENOSCYPHUS FRAXINEUS*

ZAVRŠNI RAD

ZAGREB (RUJAN, 2023.)

PODACI O ZAVRŠNOM RADU

Zavod:	Zavod za zaštitu šuma i lovno gospodarenje
Predmet:	Šumarska fitopatologija
Mentor:	prof. dr. sc. Danko Diminić
Asistent – znanstveni novak:	
Student:	Ivan Vajdić Dretar
JMBAG:	0068237688
Akad. godina:	2022./2023.
Mjesto, datum obrane:	Zagreb, 2023. godine
Sadržaj rada:	Slika: 16 Karte: 1 Tablice: 2 Navoda literature: 16

Prvi put otkrivena u Poljskoj 1990-tih godina, gljiva *Hymenoscyphus fraxineus* uzročnik je bolesti jasena koja se proširila po cijeloj Europi. Koristeći se dostupnom stranom literaturom i istraživanjima u radu će biti iznesene neke od istraživanih metoda u cilju zaštite poljskog jasena od fitopatogene gljive *Hymenoscyphus fraxineus*. Te metode uključuju detekciju spora gljive prije pojave simptoma na stablima jasena te korištenje drugih vrsta gljiva koje imaju antagonistično djelovanje na *Hymenoscyphus fraxineus* te usporavaju ili ograničavaju njeno širenje i razvoj bolesti.

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

U Zagrebu, 21.9.2023. godine

vlastoručni potpis

Upisati ime i prezime

Sadržaj

Uvod.....	1
1. Poljski jasen	2
1.1. Uvijeti za rast poljskog jasena	2
1.2. Morfologija poljskog jasena	3
2. <i>Hymnoscyphus fraxineus</i> (T. Kowalski) Baral, Queloz i Hosoya 2014	4
2.1. Sistematika.....	4
2.2. Biologija	4
2.3. Simptomi.....	5
3. Metode prevencije.....	5
3.1. Praćenje zaraze	5
3.1.1. Metode i materijali	6
3.1.2. Rezultati	7
3.1.3. Rasprava.....	9
3.2. Primjena prirodnog antagonizma gljivica otkrivenih na lišću za vrijeme vegetacije	10
3.2.1. Metode i materijali	11
3.2.2. Rezultati	13
3.2.3. Rasprava.....	17
3.3. Primjena prirodnog antagonizma gljivica pronađenih u listincu.....	18
3.3.1. Metode i materijali	18
3.3.2. Rezultati	21
3.3.3. Rasprava.....	24
Zaključak.....	26
Literatura.....	28

Uvod

Poljski jasen (*Fraxinus angustifolia* Vahl) brzorastuća, heliofilna, listopadna vrsta iz porodice *Oleaceae* s izraženim pionirskim svojstvima. Vrsta je uglavnom vezana za nizinska područja i poplavne šume uz korita velikih rijeka u kontinentalnom dijelu Hrvatske, na mediteranskom predjelu će zauzimati više nadmorske visine. Poljski se jasen javlja u nizu fitocenoloških zajednica poput *Genisto elate* – *Quercetum roboris*, Horvat 1938.; *Carpino betuli* – *Quercetum roboris*, Anić 1959. ex Rauš 1969.; *Leucojo aestivi* – *Fraxinetum angustifoliae*, Glavač 1959. .

Posljednjih trideset godina dolazi do izrazito visoke stope odumiranja poljskog jasena na području cijele Europe. Jedan od razlog su klimatske promijene to jest utjecaj klimatskih ekstrema te promijene u temperaturi zraka kao i promjene hidrološkog režima (Mikac 2020). No unatoč tome kao najveći uzročnik odumiranja stabala poljskog jasena pokazala se fitopatogena gljiva *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz i Hosoya 2014, koja je u Hrvatskoj prvi put zabilježena 2009. godine. Bolest zahvaća stabla različite starosti bez obzira na stanište i način gospodarenja, te uzrokuje niz simptoma (nekroze lišća, odumiranje izbojaka i grana, rakaste tvorevine, ...). U svojem anamorfnom stadiju (*Chalara fraxinea*, T. Kowalski 2006) koja služi kao sprematogeni stadij, dok u savršenom obliku zarazu provodi askosporama koje se raznose vjetrom te su kratkog životnog vijeka (Landot, Gross, Holdenrieder, Pautasso 2016).

1. Poljski jasen

Poljski jasen je rasprostranjen na području Europe, zapadne Azije i sjeverne Afrike. Javlja se uz rijeke jadranskog slijeva te u nizinskim poplavnim šumama, gdje je jedna od najvažnijih vrsta. Listopadna je jednodomna, mezomorfna, anemohorno-hidrohorna vrsta. Poljski jasen je brzorastuća vrsta s izraženim pionirskim svojstvima, brzom ontogenezom i velikim sukcesijskim potencijalom na nešumske površine pomoću lakog i mobilnog sjemena (Mikac 2020). Cvate od travnja do svibnja, prije listanja, a plodovi sazrijevaju u rujnu.



Slika 1. Poljski jasen (*Fraxinus angustifolia* Vlah.), izvor:http://pd-zagorske-steze.hr/Park_picelj_parcele/parcela_58.htm

1.1. Uvjeti za rast poljskog jasena

Vrsta dobro uspijeva u područjima blaže klime s količinom oborina između 400 i 1200 mm godišnje. Euritermna je vrsta i osjetljiv na niske temperature i mrazove te se ne može prirodno širiti sjeverno. Može uspjeti u sjevernim predjelima u obliku kultura no tada ne rađa sjemenom. Raste u poplavljenim nizinama no može rasti i na isušenim padinama gdje će podnijeti konkurenciju drugih vrsta. Preferira pH tla između 5 i 8 te glinasta ili umjereno zbijena tla. Izraziti je higrofit koji dobro podnosi dugo stajanje poplavne vode kao i višak ugljikovog dioksida i nedostatak kisika. Unatoč tome zahtjeva stanište s barem dva mjeseca vegetacije bez stajuće vode (Ugarković i Oršanić 2020).



Slika 2. Rasprostranjenost poljskog jasena

1.2. Morfologija poljskog jasena

Stablo najčešće dosegne visinu od 15 m no u povoljnim uvjetima može narasti i do 30 m i doseći promjer od 1 m. Kora je kod mladih stabala tanka i glatka, kasnije će ispucati u obliku pločica te poprimiti sivu boju. Raspored grana u krošnji je gust te je ona duguljasta i ovalna. Izbojci su maslinasti do žutosive boje, posuti su lenticelama, manje spljošteni u nodijima. Pupovi su svijetlo do tamnosmeđe boje, nasuprotnog su rasporeda, na vrhu izbojka se nalaze u pršljanima s do 3 bočna pupa i najvećim terminalnim pupom. Lišće je neparno perasto sastavljeno, sastoji se od 1-7 pari polimorfnih listića koji su do 10 cm dugi i od 0,5 do 3 cm široki. S gornje su strane listići goli, a s donje strane uz glavnu žilu imaju redovito čuperke svijetlo smeđih dlačica. Rubovi su listova krupno nepravilno pilasti. Cvjetovi su u obliku razgranatih metličastih cvatova crvenosmeđe boje, cvatu u travnju i svibnju. plodovi su u obliku kopljastih perutke, a sjemenka koju sadrže je uvijek duža od polovine perutke. Plodovi sazrijevaju u 9. mjeseci i nakon toga se još neko vrijeme zadržavaju na izbojcima (Franjić, Škvorc 2020).



Slika 3.. Morfologija lista poljskog jasena, izvor: https://www.researchgate.net/figure/Number-of-leaflets-variation-of-Fraxinus-angustifolia-Vahl-Narrow-leafed-Ash_fig7_281387639



Slika 4. pup poljskog jasena, izvor: <https://www.sumfak.unizg.hr/~dendrolo/atlas/063a.htm>

Poljski jasen razvija široki plitki korijenski sustav, iz bočnih žila korijenovog sustava razviti će se mnoštvo tzv. ponirućih žila koje se spuštaju do te dubine na kojoj mogu crpiti kapilarnu vodu iz podzemnih tokova.

2. *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz i Hosoya 2014

U Europi je prvi put otkrivena u Poljskoj 1990-tih godina, najvjerojatnije je uvezena iz Azije sa sadnicama *Fraxinus mandshurica* Rupr. Od onda se proširila po cijeloj Europi, a u Hrvatskoj je prvi put zabilježena 2009. godine (Barić i Diminić 2010). Danas je poznato da je ova gljiva glavni uzročnik bolesti i odumiranja poljskog jasena u Hrvatskoj. Ova gljiva može zaraziti sve tri vrste jasena koje se nalaze na području Hrvatske. Metode kontrole širenja ove gljive su danas vrlo limitirane.

2.1. Sistematika

Carstvo: *Fungi*

Odjel: *Ascomycota*

Razred: *Leotiomycetes*

Red: *Helotiales*

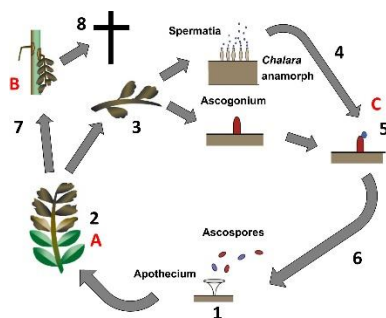
Porodica: *Helotiaceae*

Rod: *Hymenoscyphus*

Vrsta: *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski), Baral, Queloz i Hosoya

2.2. Biologija

Hymenoscyphus fraxineus formira apotecije na peteljka otpalog lišća u listincu. Gljiva može na zaraženim peteljka u listincu preživjeti više godina, u povoljnim uvjetima će formirati apotecije. Primarnu zarazu lišća se događa tijekom ljeta, a vrše ju askospore koje se raznose vjetrom kroz nekoliko tjedana. Infekcija je uspješnija uslijed viših oborina i u uvjetima povišene zračne vlage jer potiče oslobađanje askospora (Kirisits i dr. 2009). Da bi se ostvarila zaraza stablo mora primiti visoku količinu spora. Uz savršeni stadij javlja se i anamorfni stadij *Chalara fraxinea* (T. Kowalski 2006) koja služi isključivo kao spematogeni stadij (Landot, Gross, Holdenrieder, Pautasso 2016). Također uzrokuje otpadanje lišća, micelij gljive nakon toga i u odsustvu novih spora prodire u tlo dok ne dođe do korijena novog stabla jasena koje će inficirati.



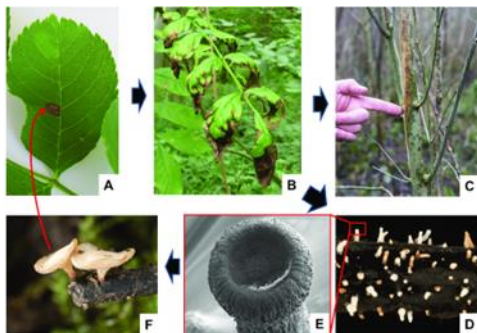
Slika 5. Biološki ciklus *H. fraxineus*, izvor: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ppa.12539>

Biologija vrste danas još nije u potpunosti razjašnjena.

2.3. Simptomi

Različiti tipovi zaraze ovom gljivom imaju drastično različite posljedice na stabla krećući se od asimptomatske zaraze do lakih i težih oslabljenja stabala pa sve do odumiranja čitavih sastojina.

Kad ova gljiva inficira lišće može se javiti u asimptomatskom obliku ili se može primijetiti u obliku nekrotičnih pjega na lišću. Većina zaraženog lišća će otpasti bez da je došlo do zaraze peteljke (Schwanda i Krisits 2016), no u rijetkim slučajevima micelij će ući u peteljku te uzrokovati daljnje odumiranje izbojaka i grana (Landot, Gross, Holdenrieder, Pautasso 2016). Na kori se mogu pojaviti diskolorirana ukleuča, ona će se širiti dok u potpunosti ne obuhvate granu ili deblo te prouzrokuju njegovo odumiranje. Također može uzrokovati rakaste tvorevine na deblu i granama stabala.



Slika 6. Simptomi zaraze *H. fraxinus*, izvor: https://www.researchgate.net/figure/Life-cycle-of-the-H-fraxineus-A-Individual-ascospores-of-Hymenoscyphus-fraxineus-land_fig1_318595326

3. Metode prevencije

3.1. Praćenje zaraze

Za kontrolu ove invazivne gljive ključno je poznavati načine njenog širenja. Ova informacija je vrlo bitna prilikom razvoja strategije za sprječavanje širenja bolesti i njenog uništavanja. Kod patogenih gljiva koje se šire zrakom, sprečavanje njihova širenja se pokazalo osobito teškim. To je u najvećoj mjeri zbog nedostatka informacija o daljinskom rasprostranju njihovih spora, što smanjuje mogućnosti njihove izolacije na određenom području.

Podaci o širenju zaraze su esencijalni za poduzimanje efektivnih mjera prevencije no moraju biti poznati u ranim fazama širenja bolesti. Dobar način za upoznavanje karakteristika širenja bolesti bez da se promatra nekoliko godina postepeno širenje je primjena klopki za spore. Iako su klopke s kvantitativnim PCR-om često primjenjivane za detekciju biljnih patogena njihova sposobnost da detektiraju patogene na području koje je napadnuto rijetko je testirana (Jackson i Bayliss 2011).

Mogu se razlikovati dva tipa klopki koji se primjenjuju: pasivne (wood-discs, petri dishes, Air-O-Cell) i aktivne (rotating arm impaction device, Burkard samplers). Pasivne klopke su pogodnije za epidemiološki monitoring, prilagođenije su za veća istraživanja jer su jeftinije i lakše se njima upravlja. Osjetljive su na klimatske ekstreme i oštećenja koja dovode do smanjene efikasnosti. Aktivne su klopke efikasnije no imaju određena ograničenja. Za rad s njima potrebno je stručno osoblje, baterije su im kratkog životnog vijeka i skuplje su, te kao takve nisu pogodne za monitoring većih područja (Grosdidier, Loos, Husson, Cael, Scordia i Marc, ais 2018).

Na temelju istraživanja provedenih u Francuskoj dalje u tekstu raspraviti će se primjena ovih klopki pri detekciji spora *Hymenoscyphus fraxineus* na području gdje se patogen prvi put pojavljuje te dokumentirati njegove navike širenja na prostornoj razini. Za ovo će se primjenjivati dvije metode kroz četiri godine. Prva se metoda bazira na opažanju simptoma bolesti jasena, a pri drugoj metodi koriste se pasivne klopke s preciznim PCR-om u realnom vremenu.

3.1.1. Metode i materijali

Francuska služba za zdravstveno stanje šuma daje izvješća bazirana na vizualnom opažanju simptoma bolesti jasena sve od 2008. godine kad je bolest prvi put otkrivena u zemlji. Uz svakom se izvješću navodi lokacija, tip sastojine, datum opažanja kao i potvrda o zarazi ustanovljena laboratorijskom analizom. Analiza se provodi na kvadratnim ploham dimenzija 16 x 16 km. Također podnose izvješća o sastojinama koje ne pokazuju simptome zaraze unatoč činjenici da se nalaze blizu onih sastojina koje su zaražene (Grosdidier, Ioos, Husson, Cael, Scordia i Marc, ais 2018).

Za sezonsko praćenje širenja bolesti pomoću klopki odabrane su dvije lokacije Gremecey i Seichamps na sjeveroistoku Francuske. Tamo su postavljene pokusne plohe u dvije mladim sastojinama jasena. U svakoj sastojini je postavljeno šest klopki. 2010. godine klopke su bile primjenjivane od 6 do 48 dana ovisno o godišnjem dobu (6-10 dana u svibnju, 25-42 dana od lipnja do kolovoza i 30-48 dana od rujna do studenog 2011., 2012. klopke su bile primijenjene 15 dana). Eksperiment je trajao od 10.4.2010. do 16.3.2012. te je po završetku 2012. preko 90% stabala na obje sastojine pokazivalo simptome bolesti.



Slika 7. Pasivna klopka za spore, izvor: <https://spornadosampler.com/2018/04/05/setting-the-trap-early-warnings-of-late-blight-using-passive-spore-traps/>

Za praćenje bolesti na lokalnoj razini odabrana je pokusna ploha Champenoux na sjeveroistoku Francuske. Područje je pretraženo da bi se odredila precizna pozicija stabla jasena u čijem je tkivu molekularnim testiranjem utvrđena prisutnost *H. fraxineus*. Klopke su postavljene na udaljenosti od 800 m od zaraženih stabala i na jednakoj udaljenosti preko cijele sastojine. 2011. klopke su postavljene na 52 lokacije, na tri 15 dnevna razdoblja od ranog srpnja do sredine kolovoza. Zatim su zadnjih 15 dana srpnja 2012. klopke postavljene na 124 lokacije, te na 130 lokacija prvih 15 dana 2013. s povećanom količinom uzoraka na klopka 600 – 800 m od zaraženih stabala.

Za praćenje bolesti na regionalnoj razini postavljene su četiri pokusne plohe na kojima su klopke bile postavljene blizu stabala jasena u 15 dnevnom periodu od sredine lipnja do sredine srpnja od 2012. – 2015.. Prve dvije lokacije su bile u centralnoj Francuskoj dok su treća i četvrta bile u jugoistočnom dijelu zemlje i u dolini Rhone. Plohe 3 i 4 su postavljene na specifičnim lokacijama da bi se u obzir uzela i temperaturna varijabilnost na tom području.

Što se tiče dizajna samih klopki bio je baziran na modificiranom protokolu Schweigkofler i dr. (2004.), kako je i opisan u Grosdidier i dr. (2017). klopke su bile postavljene na polisitirene blokove 1m iznad tla s no.1 Whatman filterom promjera 150 mm. Ovaj filter je primijenjen na svim lokacijama osim na lokaciji broj 4 gdje je korišten no.3 Whatman filter. Filter je bio premazan „4x TE buffer“ otopinom da bi se spriječilo klijanje spora. Primjenjivana je negativna kontrola kako bi se potvrdilo odsustvo kontaminacije za vrijeme analize. To je postignuto tako da je hermetički zatvoreni filter bio postavljen na početku eksperimenta sa strane svake klopke te je tamo ostao do kraja eksperimenta. Po završetku eksperimenta klopke su bile uzorkovane i primijenjene za ekstrakciju DNK *H. fraxineus*. Pri ekstrakciji korištena su četiri pozitivna uzorka otopine sa sporama *H. fraxineus* i četiri negativna uzorka sterilne vode. To je napravljeno radi kontrole kvalitete. Da bi se izbjegla pristranost prilikom analize filteri su bili birani omaške prije ekstrakcije i PCR-a.

Umnožavanje PCR-om u stvarnom vremenu provedeno je prema loss-u i sur. (2009a,b), s tom iznimkom da je svaki put provedeno u 45 ciklusa. Svaki put su u analizi korištena barem dva uzorka sterilne vode. Kroz godine su korišteni različiti standardni uzorci, za prvi i drugi eksperiment su korištene kalibrirane otopine askospora *H. fraxineus*, za I i II plohu trećeg eksperimenta je korišten genomski DNK, a za III i IV plazmatski DNK.

Provedena je usporedba rezultata dobivenih metodom bilježenja simptoma i metodom primjene klopki. Korišteni su rezultati klopki iz trećeg eksperimenta s tim da su korišteni rezultati samo onih koje su pale u krug radijusa 24 km da bi se dobila približno jednaka površina plohi 16 x 16 km. Za svaku su plohu klopke bile podijeljene u četiri kategorije: A) u klopki je pronađen DNK *H. fraxineus* i na tom području su zabilježeni simptomi bolesti; B) u klopki je pronađen DNK *H. fraxineus* ali na tom području nisu zabilježeni simptomi bolesti; C) u klopki nije pronađen DNK *H. fraxineus* ali na tom području su zabilježeni simptomi bolesti; D) u klopki nije pronađen DNK *H. fraxineus* i na tom području nisu zabilježeni simptomi bolesti. Učestalost je svake kategorije bila obračunata.

Izveštaj za odumiranje jasena uzet je u obzir za godinu hvatanja i za naredne dvije godine. Prva je analiza binomnog generaliziranog linearnog modela provedena korištenjem podataka dobivenih iz klopki kao varijable odgovora. Godina hvatanja i godine kad je opažena prisutnost postavljene su kao eksplikativne varijable. Vjerojatnost da zamke otkriju spore na području gdje je prema izvješćima prisutna zaraza, ovisno o tome koliko je dugo prisutna na tom području, kvantificirano je omjerom izgleda. Za drugu su analizu također uzeti podaci o prisutnosti bolest kao varijable odgovora. Dalje su odabrane samo klopke koje su se nalazile više 50 km od fronte bolesti kako bi se izbjegla pristranost.

3.1.2. Rezultati

Lokalna razina

Klopke su kroz sve eksperimente na lokalnoj razini otkrile od 2 -2560 spora u danu po m². Inokulum koji se širi zrakom otkriven je potkraj proljeće i ljeti 2010. i 2011. 2010 je vrhunac sporulacije dosegnut u srpnju, a 2011. u lipnju. Nije bilo značajne razlike u količini spora koje su uhvaćene na lokaciji u Gremecey i onih koje su uhvaćene u Seichamps. S obzirom da je prve godine bilo utvrđeno da je optimum za hvatanje spora bio između lipnja i srpnja, odlučeno je da će se hvatanje provoditi u tom povoljnom periodu u trajanju od 15 dana.

Najveći je broj spora otkriven u onim klopka koje su bile neposredno do zaraženih stabala jasena. Taj se broj rapidno smanjio unutar prvih 50 m do stabla i ostao vrlo nizak do granice od 500m. spore nisu pronađene u klopka udaljenim više od 500 m od zaraženih stabala.

Efikasnost klopki je bila niska s 0,47 s intervalom pouzdanosti od 0,31 – 0,67. Dobivenim podacima bolje odgovara jezgra inverznog zakona potencije od Gaussove jezgra za koju je utvrđena udaljenost disperzije 173 m dok je za jezgru inverznog zakona potencije 1375m. Parametar k je za obje jezgre procijenjen na 1,13 s intervalom pouzdanosti 0,25 – 2,06, što upućuje na visoku prekomjernu disperziju podataka.

Tablica 1. kriterij odstupanja i parametri disperzije na lokalnoj i regionalnoj razini, izvor: <https://academic.oup.com/femsec/article/94/5/fiy049/4950393?login=false>

Table 2. Deviance information criterion (DIC) and parameters of the dispersal models adjusted at the local and regional scales.

Kernel distribution	Local scale		Regional scale	
	Gaussian isotropic distance kernel (thin-tail)	Inverse power-law isotropic distance kernel (fat-tail)	Gaussian anisotropic location kernel (thin-tail)	Inverse power-law anisotropic location kernel (fat-tail)
DIC	848.6	826.3	923.6	911.2
Parameters ^a	Mean [CI 95%]	Mean [CI 95%]	Mean [CI 95%]	Mean [CI 95%]
σ_1^2	2.03 [0.75–110.5]	2.08 [0.80–58.34]	9.86 [3.58–657.89]	11.57 [4.11–1564.94]
σ_2^2	17.68 [12.06–40.65]	18.76 [12.21–38.52]	–	–
a	195.62 [13.13–473.74]	206.26 [9.67–498.6]	0.59 [0.18–1.33]	2.56 [0.08–7.65]
b	–	3.30 [2.00–5.67]	–	5.56 [2.50–9.39]
p	0.53 [0.31–0.69]	0.53 [0.35–0.69]	0.69 [0.37–0.83]	0.71 [0.45–0.84]
k	1.13 [0.27–2.09]	1.13 [0.23–2.02]	0.31 [0.03–0.54]	0.33 [0.04–0.57]
γ	–	–	0.35 [0.10–0.54]	0.34 [0.06–0.54]
β	–	–	1.28 [0.37–2.58]	1.28 [0.20–2.54]
Mean dispersal distance (km) ^b	0.17 [0.01–0.42]	1.38 [0.64–3.32]	0.59 [0.18–1.33]	2.56 [0.08–7.65]

^aThe Gelman–Rubin test indicated convergence for all reported parameters (Rhat very close to 1).

^bFor the anisotropic kernel, mean dispersal distance of $\frac{2a}{k}$ for the Gaussian distance kernel and $\frac{2a}{k}$ for the inverse power-law distance kernel. For isotropic kernels, the mean dispersal distance is given by parameter a. Results are converted to kilometers.

Regionalna razina

Učestalost DNK *H. fraxineus* na filterima ovisila je o godini uzorkovanja s 39% klopki na lokaciji 1. 2012., 7% na lokaciji 2. 2013., 34% na lokaciji 3. 2014. i 10 % na lokaciji 4. 2015. U obzir su uzeti i 341 filter pomoću koji se provodila negativna kontrola te su predviđeno dali negativne rezultate.

Uspoređivani su rezultati dobiveni iz klopki i izvješća o širenju bolesti. 2012. u klopka su pronađene spore *H. fraxineus* na udaljenosti od 38 km od fronte bolesti, 2013. pronađene su na udaljenosti od 116 km, 2014. na 56 km i 2015. na 13 km. Broj detektiranih spora se je drastično smanjivao s udaljenošću od zaražene sastojine te se stabilizirao na udaljenosti od 5 – 20 km. Na većoj udaljenosti broj spora je bio vrlo nizak. Za klopke koje su bile smještene u krugu od 20-tak km od fronte bolesti nije primijećena preferencija smjera širenja kod klopki u odnosu na izvješća bolesti. Međutim kod klopki koje su bile na udaljenostima većim od 25 km od fronte bolesti primijećeno je preferencija bolesti za širenje na jugozapad i jug. Dakle na regionalnoj razini testirana je anizotropna jezgra za analizu širenja bolesti. Kriterij je za odstupanje bio viši za Gaussovu jezgru. Efikasnost klopki je bila 0,30 s pouzdanošću od 0,17 – 0,59. Srednja udaljenost između klopki koje su detektiraju *H. fraxineus* i izvješća o širenju bolesti je bila 590 m za Gaussovu jezgru i 2560 m za jezgru inverznog zakona snage.

Jugozapadni smjer širenja s parametrom koherentnosti β (1,28) i parametrom pomaka γ većom od 0 (0,35). Parametar k je procijenjen na 0,32 što ukazuje na nisku pretjeranu disperziju podataka.

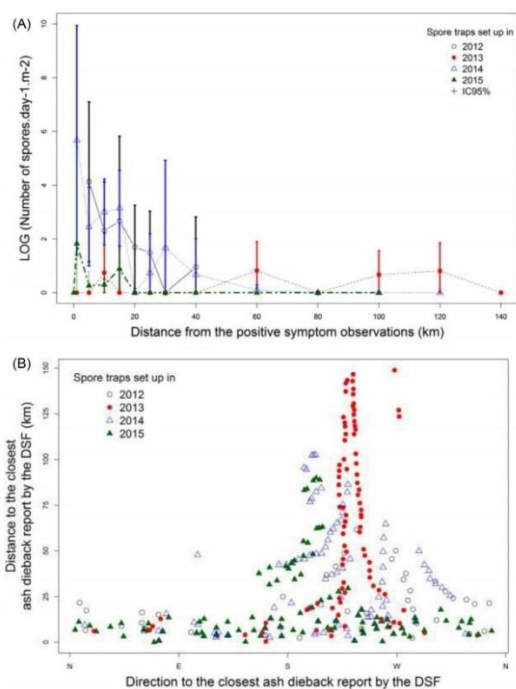


Figure 4. *Hymenoscyphus fraxineus* detected by the traps according to the distance from the nearest ash dieback reported by the DSF. (A) Quantities of spores of *H. fraxineus* caught by the traps per day and per square meter. (B) Anisotropy in long-distance dispersal of *H. fraxineus* ascospores.

Slika 8. A) količina spora uhvaćenih klopka u jednom danu na m²; B) anizotropija širenje askospora, izvor: <https://academic.oup.com/femsec/article/94/5/fiy049/4950393?login=false>

3.1.3. Rasprava

Proučavanjem širenja ove bolesti na više razina utvrđeno je da klopke imaju nisku učinkovitost, što potvrđuje i činjenica da su apoteciji *H. fraxineus* pronađeni na lokacijama gdje u klopka nisu pronađene spore. No, mogu pružiti korisne informacije i otkriti prisustvo patogena na udaljenosti od 100 km od fronte bolesti. Jedan od razloga za ovu nisku učinkovitost klopki može biti predugi period izlaganja filtera okolini. Odabran je period od 15 dana da bi se mogla uzeti u obzir i varijabilnost klime. To je za posljedicu imalo da je dobar dio uhvaćenih spora ispran s filtera za vrijeme kišnih razdoblja ili je za vrijeme nekih drugih nepovoljnih vremenskih uvjeta poput suša ili vjetrova uzorak smanjuju. Za primjer možemo uzeti lokaciju 2. iz trećeg eksperimenta gdje su 2013. zabilježeni niži rezultati uslijed jakih grmljavinskih nevremena na tom području. Za uračunavanje ove varijabilnosti klime pri analizi su korišteni slučajni faktor perioda ($\delta 1$) i slučajni faktor mjesta ($\delta 2$). Efekti ispiranja mogli su se kontrirati time da se u filtere stavljao petrolejev gel koji je sprječavao ispiranje spora s filtera. Chandelier i dr. (2014.) događaju sporulacije ovise o klimi, ekstremni klimatski događaji mogu biti kritični za učinkovitost klopki npr. 2015. zabilježena je niža učinkovitost što se može objasniti toplinskim valom koji je u tom periodu bio na tom području. Bitan faktor je bilo znati kad je vrhunac sporulacije da bi se povećale šanse za detekciju spora. Na sjeveroistoku Francuske je sporulacija trajala od sredine lipnja do sredine kolovoza, a vrhunac je bio od kraja lipnja do početka srpnja.

Unatoč niskoj efikasnosti klopki i možda nepotpunim izvješćima o širenju bolesti, ovo istraživanje nam daje korisne podatke o samom dometu spora *H. fraxineus*. Disperzija spora je posteriorno asimetrična te je zbog toga bilo teško odrediti srednju udaljenost disperzije. Ovisno o jezgri koja se primjenjuje procjenjuje se na 0,2 – 2,6 km. Testirano je više modela disperzije no nisu doveli do jasnog oblika jezgre. Podacima najbolje odgovara jezgra inverznog zakona snage, na lokalnoj i regionalnoj razini. Ova

jezgra također može objasniti detektirane spore na udaljenostima od 100 km koje su potvrđene nizom PCR testova na temelju DNK dobivenog iz klopki.

Uzorkovanje na većim udaljenostima od fronte bolesti na regionalnoj razini bilo je daleko veće nego na lokalnoj razini što objašnjava zašto smo otkrili više slučajeva daljinskog širenja bolesti na toj razini. Srednja udaljenost disperzije koju nam daje inverzni zakon snage slična je na lokalnoj i regionalnoj razini. Dio varijabilnosti može se objasniti različitim faktorima koji su prisutni na različitim lokacijama koji utječu na asimetričnu distribuciju spora. Uzevši u obzir da je parametar k na lokalnoj razini bio iznad 1, a na regionalnoj ispod 1, jedan od razloga može biti da na lokalnoj razini nije uzeta u obzir anizotropija.

Na lokalnoj razini spore su detektirane na udaljenosti do 500 m od zaraženih stabala. To se može objasniti činjenicom da vjetar spore može prenijeti na udaljenostima od više stotina metara. Ako se spore oslobode za vrijeme turbulencije vjetar ih diže iznad krošanja i raznosi na veće udaljenosti. Ovaj je fenomen čest za spore veličine do 10 μm , što je u rasponu spora *H. fraxineus*.

Na regionalnoj razini spore se mogu detektirati i do 100 km od fronte bolesti. Sama pojava askospora na tim udaljenostima ne znači da će se stvoriti novo žarište bolesti, to ovisi o okolišu i uvjetima koji na njemu vladaju. Kad bi te askospore uspostavile žarišta bolesti imale bi nerazmjern utjecaj na širenje bolesti. Brzina širenja bolesti na razini Europe ili pojedinih država procijenjena je na 40 – 75 km godišnje što se podudara s brzinom širenja koja je zabilježena u Francuskoj. Također je zabilježena pauza od 1 - 2 godine između pojave spora i pojave prvih simptoma na stablima.

Iz modela širenja spora može se vidjeti da većina spora ostaje blizini zaraženih stabala. Te se informacije mogu primijeniti pri izradi strategije za suzbijanje bolesti npr. pri određivanju površine koja se treba tretirati. Dok bi se sustav klopki mogao koristiti da bi se dobio bolji uvid u lokalne uvjete. Ključno je za suzbijanje bolesti i njena rana detekcija jer ako se otkrije tek nakon nekoliko godina vrlo je vjerojatno da se više neće moći suzbiti. Unatoč tome primjena metode klopki neće zamijeniti izvješća o pojavi i širenju bolesti koja podnose stručni kadrovi koji rade na upravljanju šumama blizu fronte bolesti.

3.2. Primjena prirodnog antagonizma gljivica otkrivenih na lišću za vrijeme vegetacije

Neke vrste jasena poput *Fraxinus mandshurica* Rupr. i *Fraxinus ornus* L. imaju prirodnu otpornost - tolerantnost na patogena *Hymnosyphus fraxineus*. Takva se nasljedna tolerantnost može primijetiti i kod običnog jasena no pretpostavlja se da je to pod velikim utjecajem mikroorganizama koji se nalaze na stablu. Te bakterije ili gljive mogu direktno suzbiti bolesti kompeticijom za resurse, parazitizmom ili antibiozom i indirektno aktivacijom obrambenog sustava biljke. Također neki endofiti promoviraju rast i razvoj biljke te time povećavaju njenu otpornost na patogene (Glick, 2012; Hossain i dr., 2017).

Da bi se procijenila uloga tih endofita na otpornost stabla prema odumiranju zbog zaraze *H. fraxineus* provedena je serija istraživanja pri kojoj su uzeti uzorci gljivičnih zajednica s lišća i izbojaka. Različiti su pristupi pokazali veliku varijabilnost unutar zajednica koja je uzrokovana različitim lokacijama, godišnjim dobom i samim genotipom biljke. Osobito su se razlikovale zajednice uzete s izbojaka, ne samo između vrsta jasena nego i između genotipova. Unatoč tome nije pronađena direktna veza koja bi pokazivala podložnost zarazi *H. fraxineus*. Pri višoj razini zaraze *H. fraxineus* veća je i raznolikost između ostalih prisutnih gljiva i veća je prisutnost specifičnih rodova (Griffiths i dr. 2020).

Zbog ove kompleksne ravnoteže između otpornosti genotipa i prisutnih mikroorganizama teško je izolirati specifične gljive koje imaju potencijala za suzbijanje bolesti. Do sad je identificirano samo nekoliko vrsta koje su jasno povezane s tolerancijom na *H. fraxineus*. Analizom zajednica uzetih s tolerantnog *Fraxinus mandshurica* otkriveno je da je dominantni rod *Mycosphaerella*, ovo se odnosilo samo na stabla iz istočne Rusije. Na zdravim stablima običnog jasena (*F. excelsior*) pronađeni je u većim količinama *Aureobasidium pullulans* (de Bary & Löwenthal) G. Arnaud 1918, dok su kod onih zaraženih stabala bile prisutnije vrste iz rodova *Alternaria* i *Cytospora*.

Neka su istraživanja bila usmjerena na *in vitro* testove endofita s lista jasena radi utvrđivanja antagonizma prema patogenu. Neki su od tih izolata pokazivali jasni antagonizam. Također je ustanovljeno da su često *H. fraxineus* i endofiti inhibirani zbog međusobnog antagonizma.

Dalje ćemo raspravljati o istraživanju provedenom u Njemačkoj koje je provedeno da bi se proučio biološki potencijal pojedinih gljiva u kontroli *H. fraxineus*. Korištene su dvije metode za proučavanje tih endofita: sekvenciranje visoke propusnosti i metode uzgajanja na hranjivim podlogama. Pri tome su korišteni uzorci s zaraženih stabala i s ovih koja su tolerantna, nakon toga je provedena komparativna analiza da bi se otkrilo koji su rodovi ili vrste specifični za tolerantna stabla. Istovremeno izolati u bili testirani za svoje inhibitorno djelovanje na *H. fraxineus*. Na temelju toga najbolji izolati su bili procijenjeni u statističkom testu za njihov antagonizam prema patogenu.

3.2.1. Metode i materijali

Lisni materijal za istraživanje je dobiven iz četiri različite zone na sjeveroistoku Njemačke, a skupljan je u srpnju 2017. Na svakoj su lokaciji za uzorkovanje odabran četiri para stabala od kojih je jedno bilo zaraženo (K), a jedno tolerantno (P). Dugoročnim monitoringom otkriveno je da su tolerantna stabla vrlo rijetka u sastojinama koje su zaražene *H. fraxineus*.

Analiza i sekvenciranje ITS2 područja

Za visoku mogućnost usporedbe između analiza ukupna količina DNK koja je korištena kod istraživanja bakterijskih zajednica korištena je i kod gljivičnih zajednica. Zbog svoje manje varijabilnosti duljine i veće genetske raznolikosti za ovo je odabrano ITS2 područje rDNK molekule. Ono je zatim bilo amplificirano primerima fITS7 i ITS4 što je ujedno spriječio amplifikaciju DNK biljke domaćina. PCR amplifikacija je provedena kako je opisano od strane Ihrmark i dr. (2012). Primeri su bili produženi na heterogenim razmacima u barkod sekvencama. Replicirani su dijelovi zatim bili poredani po veličini koristeći tehniku „gel electrophoresis“, zatim su pročišćeni pomoću MSB Spin PCRapace kit, te su miješani do ekvimolarne koncentracije DNK. Pripreme za skladištenje su provedene u LGC Genomics Berlin. Sirovi su podaci sekvencionirani bili analizirani pomoću Mothur v. 1.39.1. ITS2 područje je bilo izolirano tako da su otklonjeni fragmenti 5.8S i 28S uz pomoć ITSx 1.1.2. Sekvence su bile uspoređene pomoću baze podataka UNITE s pouzdanošću od 80% za filogenetsku identifikaciju. Operativne taksonomske jedinice su generirane pomoću VESARCH algoritma na sličnosti od 97%. Filogenetski su klasificirane pomoću BLAST pretraživanja baze podataka UNITE i NCBI taksonomskog pretraživača. Svi su uzorci poduzorkovani na minimalni broj sekvenci među svim uzorcima, sva su uparena očitavanja pohranjena u javnoj arhivi očitavanja.



Slika 9. MSB Spin PCRapace kit, izvor: https://ibl.at/ecommerce/product?product_id=529930

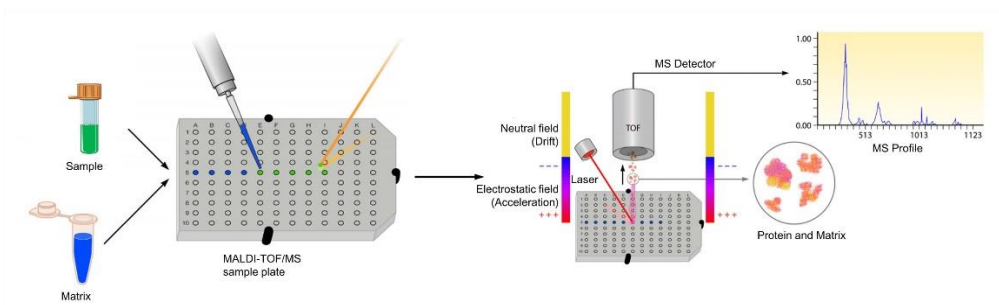
Statističke su analize bile provedene pomoću phyloseq, vegan i ape paketa u R 3.6.0 i MicrobiomeAnalyst. Za određivanje značajnih razlika između zajednica korištena je analiza sličnosti. Pomoću Krona grafikona prikazan je filogenetski sastav mikrobioma jasena.

Kultivacija gljivičnih endofita

U 0,8 % otopini natrijeva klorida (NaCl) mljeveno lišće jasena je bilo razrijeđeno te nanoseno na PDA agarne hranjive podloge, te ostavljeno 7-10 dana na sobnoj temperaturi da bi se inkubiralo. Da bi se odredila gustoća populacije izbrojane su jedinice koje tvore kolonije (CFU) te su izražene po gramu svježe težine. Za analizu je nasumično bilo odabrano oko 50 izolata po uzorku. Čiste su kulture bile sastrugane i prebačene u posebne petrijeve zdjelice s agarom za pohranu i daljnju obradu dok su miceliji iz filamentoznih gljiva subkultivirani na agaru. Gljivice slične kvascima su bile pročišćene *streak plate* metodom tj. razrijeđene su na podlozi od čvrstog agara u petrijevoj zdjelici, te su bile spremljene kao krio-kulture do analize.

Dereplikacija i klasifikacija izolata

Za dereplikaciju i klasifikaciju gljivica sličnih kvascu je primjenjena „Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry“ ili MALDI-TOF MS. Prije ovog izolati su bili nasadeni na podloge od CASO agara te su bili kultivirani 24 sata na 25 °C. Nakon masovne spektrometrije izolati s rezultatima većim od 2,3 smatrani su identificiranim, rezultati s nižom vrijednosti bili su međusobno uspoređivani i grupirani na bazi rezultata preko 2,3. Reprezentativne sojevi neidentificiranih grupa klasificirani su na temelju ITS rDNK područja. Za to je ekstrahirana DNK bila resuspendirana u 0,25% otopini NaOH, nakon čega je provedena inkubacija od 15 min na 95°C. Nakon toga je proveden PCR. Nakon toga izolati su bili klasificirani koristeći bazu podataka UNITE fungal ITS verzija 8.0 (Köljalg i dr. 2013.). Imena vrsta su bila potvrđena NCBI taxonomy browserom.



Slika 10. prikaz spektrometrije-MALDI-TOF MS, izvor: <https://www.creative-proteomics.com/technology/maldi-tof-mass-spectrometry.htm>

Za klasifikaciju filamentoznih vrsta uzet je dio micelije ta je ekstrahirana njegova DNK primjenom CTAB protokola koji je opisao Doyle 1990. Filamentozne su vrste determinirane na temelju čitavog ITS područja njihove rDNK.

Provedena je analiza svih gljivičnih zajednica tako da su uzeti u obzir svi klasificirani izolati dobiveni MALDI-TOF MS ili direktnim sekvenciranjem. Uzorak B2P je uklonjen iz analize zbog premalog broja izolata. Provedeno je testiranje za značajne razlike između tolerantnih i ne tolerantnih zajednica na svim taksonomskim razinama.

In vitro testiranja antagonizma

Svi su izolati testirani za antagonizam protiv P3 soja *H. fraxineus*. Testovi su bili provedeni na PDA agarnim podlogama koje su bile obogaćene ekstraktima jasena na temperaturi od 22°C kako bi se simulirali prirodni uvjeti (Hanackova i dr., 2017). Ovisno o tipu razvoja izolata primijenjena su dva pristupa: primjena gljivica sličnih kvascu (*A. pullulans* (de Bary & Löwenthal) G. Arnaud 1918, *Papiliotrema flavescens* (Saito) Xin Zhan Liu, F.Y. Bai, M. Groenew. & Boekhout 2015, *Cystobasidium pinicola* (F.Y. Bai, L.D. Guo & J.H. Zhao) Yurkov, Kachalkin, H.M. Daniel, M. Groenew., Libkind, V. de García, Zalar, Gouliam., Boekhout & Begerow 2014 itd.) i primjena filamentoznih gljivica (*A. pullulans* (de Bary & Löwenthal) G. Arnaud 1918, *Aureobasidium* sp., *Cladosporium* sp. itd.) . U prvom slučaju u petrijevu zdjelicu je dodana kultura *H. fraxineus* , a na rubovima su se nalazile kulture četiri različite vrste gljivica sličnih kvascu. Za kontrolu su usporedno tome korištene samostalne kulture *H. fraxineus*. Širenje *H. fraxineus* je bilo mjereno nakon 7 dana i nakon 14 dana sve dok se kontrolni uzorak nije proširio do ruba petrijeve zdjelice. Efekti antagonizma su bili procijenjeni formulom „ $100 \times [(r_{\text{control}} - r_{\text{cocultivation}})/r_{\text{control}}]$ “, za statističku su analizu odabrani samo oni izolati čija je inhibicija bila preko 30%.

Filamentozne vrste su bile testirane na agarnim podlogama na koje su dodana dva ista soja *H. fraxineus* na udaljenosti od 4 cm radi testiranje međusobne inhibicije i negativnim kontrolama gdje je *H. fraxineus* bio sparen s agarnim čepom bez micelija. Radijus je mjereno na liniji između kolonija istog soja te 45° s gornje i donje strane u odnosu na tu liniju. Mjerenje se provodilo nakon 7 i nakon 14 dana. Inhibicija je procijenjena pomoću iste formule kao i kod gljivica sličnih kvascu. Izolati koji su imali višu stopu inhibicije u odnosu na samoinhibiciju ponovno su procijenjeni u statističkom testu.

Nakon ovoga procijenjen je vitalitet *H. fraxineus* koji je bio u kontaktu s izolatima. *H. fraxineus* je bio nasađen na agarne podloge obogaćene s ekstraktom jasene. Rast je procijenjen nakon 2 tjedna u odnosu na netretiranu kontrolu.

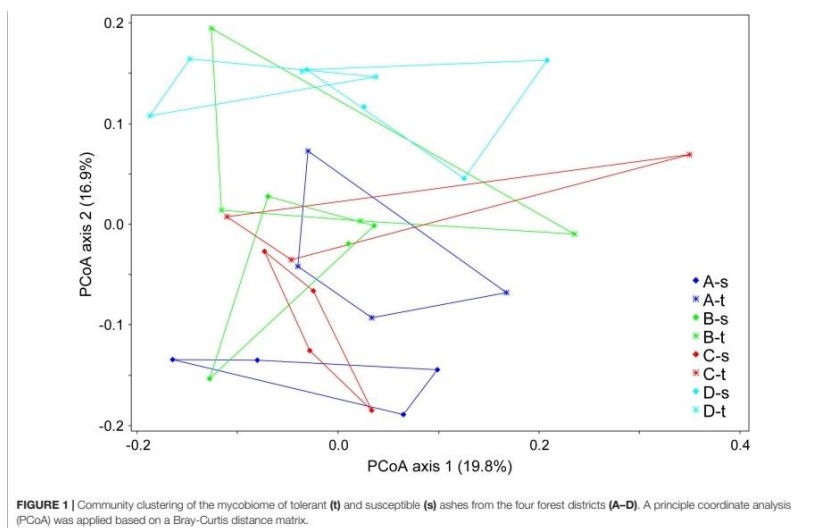
Da bi se potvrdila patogenost sojeva *H. fraxineus* koji su bili korišteni u ovom eksperimentu njima su bile zaražene dvogodišnje sadnice jasena te je praćen tijek zaraze kroz idućih 8 tjedana. Potvrđeno je da su oba soja bili virulentni.

3.2.2. Rezultati

Profiliranje na temelju ITS2 područja

Pri istraživanju su bili korišteni uzorci s 16 tolerantnih stabala i s 16 stabala koja nisu bila tolerantna. Za uzorke je uzimano lišće koje je izgledalo zdravo. Zbog visokog sadržaja *H. fraxineus* (86%) u gljivičnoj zajednici jedan je od uzoraka isključen iz testiranja. Ostali su uzorci imali relativno niski udio *H. fraxineus* (0,003%). Ukupno se moglo dodijeliti 1012 operativnih taksonomskih jedinica. Za statističku je analizu korišteno 10707 očitavanja po uzorku. Pri usporedbi tolerantnih i ne tolerantnih gljivičnih zajednica nije pronađena značajna genetska raznolikost, no analizom sastava mikrobioma otkrivena je mala ali značajna razlika u grupiranju koja ovisi o lokaciji uzorka i zdravstvenom stanju. Ukupno je

determinirano 61% *Ascomycota*, 38% *Basidiomycota* i 0,46% sekvenci nije se moglo identificirati. Najbrojnije klase su bile *Dothideomycetes* s 54% i *Tremellomycetes* s 28%, a što se vrsta tiče najbrojnija je bila *A. pullulans* (de Bary & Löwenthal) G. Arnaud 1918 s 32% te *Cladosporium* spp. S 11%, *Papiliotrema flavescens* (Saito) Xin Zhan Liu, F.Y. Bai, M. Groenew. & Boekhout 2015 s 10% i *Vishniacozyma carnescens* (Verona & Luchetti) Xin Zhan Liu, F.Y. Bai, M. Groenew. & Boekhout 2015 s 9%. Usporedbom vrsta samo je *Papiliotrema flavescens* bila prisutna u značajno većoj količini kod tolerantnih stabala s 12,3%. Također otkriveno je 18 operativnih taksonomskih jedinica s prisutnošću od 0.02% koji su bili prisutni u značajno višoj koncentraciji kod tolerantnih stabala. Analizom indikatorski vrsta otkrivena su četiri skupine tolerantnih stabla i to one koje sadrže: *P. flavescens*, *Vishniacozyma dimennae* (Fell & Phaff) Xin Zhan Liu, F.Y. Bai, M. Groenew. & Boekhout 2015, *Exobasidium* spp. i *Microstroma album* (Desm.) Sacc. 1878.



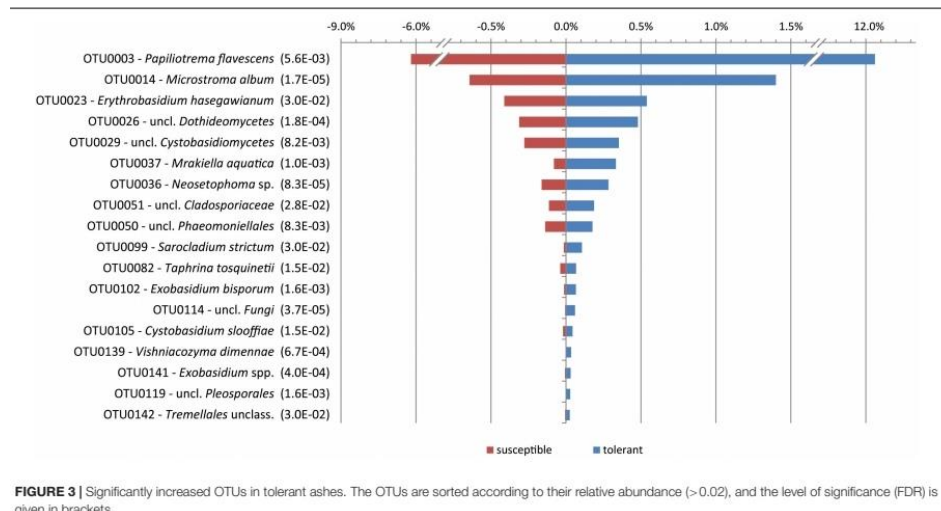
Slika 11. grupiranje zajednica s tolerantnih i osjetljivih stabala na lokacijama A-B, izvor: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.590944/full>

Kultivirane gljivične zajednice

Uz analizu genetskih markera provedena je i usporedba gljivičnih kultura s tolerantnih i ne tolerantnih stabala. Gustoća jedinica koje mogu formirati kolonije se kretala od $1 \cdot 10^4$ do $4 \cdot 10^5$ po gramu svježe težine bez obzira na zdravstveno stanje. Ukupno je izolirano 931 vrsta filamentoznih gljivica pomoću ITS rRNA sekvenciranja i 773 vrste gljivica sličnih kvascima pomoću MALDI-TOF MS tehnologije. 72% izolata su bili iz reda *Ascomycota*, a 28% *Basidiomycota*. Najzastupljeniji su bili predstavnici razreda *Dothideomycetes* s 61% i *Tremellomycetes* s 28%. na razini vrste dominirali su saprotrofski kvasci među kojima je najzastupljenija bila *A. pullulans* s 50,5%, a uz nju su bile prisutne i *P. flavescens* s 14.1%, i *V. carnescens* s 9%. *A. pullulans* koja mijenja svoj način rasta između kvasaca i filamentozne gljivice ukupno je zastupala 28% kvasaca i 69% filamentoznih vrsta te je bila najzastupljenija filamentozna vrsta dok je najzastupljeniji kvasac s 31% bila *P. flavescens*. Također *P. flavescens* javljala se u većem broju kod tolerantnih stabala no ta razlika nije mogla biti statistički osigurana, dok se *Sarocladium strictum* (W. Gams) Summerb. 2011 javljala u značajno većem broju s 24 puta većim prisustvom kod tolerantnih stabala.

od razine samoinhibicije. Pet drugih izolata inhibiralo je jedan od sojeva od 57 do 93%. Najučinkovitiji su bili izolati C1K002 i D1K008 koji su pripadnici roda *Cladosporium*. Sličan je efekt imao izolat A3K053 s stupnjem inhibicije od 72 do 76%. Oba su izolata pokazala brzi rast i unutar prvog tjedna kultivacije su nadmašili *H. fraxineus* i unutar 14 dana su skoro u potpunosti inhibirali rast *H. fraxineus*. Izolati B2K028 i D1K016 skoro su u potpunosti ubili patogen urastanjem u koloniju *H. fraxineus*. Izolat C4K037 koji je identificiran kao *Gibberella tricineta* El-Gholl, McRitchie, Schoult. & Ridings 1978 također je urastao u kolonije patogena.

Fungicidno je djelovanje uočeno kod nekoliko taksonomskih grupa i to kod izolata brzorastućih vrsta poput: *Diplodia fraxini* (Fr.) Fr. 1849, *Cladosporium* sp. i *Phomopsis velata* (Sacc.) Traverso 1906.



Slika 13. Značajno više zastupljene taksonomske jedinice kod tolerantnih stabala, izvor: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.590944/full>

Tablica 2. Antagonistička aktivnost gljivica i njihova sposobnost da inhibiraju rast *H. fraxineus*, <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.590944/full>

TABLE 1 | Antagonistic activity of yeast-like epi/endophytic fungi as assessed by the growth inhibition of *H. fraxineus* and the vitality of the remaining pathogen mycelium.

Isolate	Taxonomic assignment	Growth inhibition rate in dual culture (%) ^a		Vitality of mycelium (% of untreated control)	
		P3	HF23	P3	HF23
A3K052	<i>Aureobasidium pullulans</i>	39.2	37.3	54.9	92.2
A3P046	<i>Aureobasidium pullulans</i>	41.0	45.7*	0.0	89.3
A4K061	<i>Aureobasidium pullulans</i>	41.0	35.8	61.1	84.0
A2P099	<i>Aureobasidium pullulans</i>	40.7	36.7	0.0	85.5
C1P011	<i>Aureobasidium pullulans</i>	32.5	37.5	0.0	85.3
A3K040	<i>Aureobasidium pullulans</i>	34.6	39.2*	0.0	89.5
A1K043	<i>Aureobasidium pullulans</i>	41.3	39.8*	71.8	88.8
C4K081	<i>Aureobasidium pullulans</i>	37.5	40.0*	35.7	68.1
D1P037	<i>Aureobasidium pullulans</i>	44.9	37.8	100.0	87.0
B4P060	<i>Aureobasidium pullulans</i>	38.3	37.0	95.3	76.8
D3P009b	<i>Cystobasidium pinicola</i>	16.7	32.9	102.0	115.4
B3K004	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	37.3	34.1	87.0	84.9
C3P008	<i>Metschnikowia</i> sp.	25.9	35.8	0.0 ^b	73.6
A3P071	<i>Papillotrema flavescens</i>	25.9	38.3	0.0	93.3
A4P066	<i>Papillotrema flavescens</i>	23.5	30.3	0.0	87.8
B3P048	<i>Papillotrema flavescens</i>	27.2	25.3	0.0	100.0
A2P025	<i>Papillotrema flavescens</i>	25.6	35.0	0.0	91.9
C2P072	<i>Papillotrema flavescens</i>	23.5	33.3	100.0	66.7
C2K025	<i>Papillotrema flavescens</i>	25.9	35.8	100.0	87.5
D4K115	<i>Papillotrema flavescens</i>	25.0	37.8	94.0	97.2
C4K058	<i>Papillotrema flavescens</i>	25.7	31.3	92.3	76.0
C1P081	<i>Papillotrema flavescens</i>	25.9	37.8	81.9	94.5
D3K042	<i>Papillotrema flavescens</i>	33.3	50.0*	93.8	82.1
A3P017	<i>Vishniacozyma carescens</i>	27.5	32.1	85.3	75.0
C2K045	<i>Vishniacozyma carescens</i>	25.9	29.6	96.9	104.3
C4K010	<i>Vishniacozyma carescens</i>	30.8	47.5*	79.6	76.9
C4K012	<i>Vishniacozyma</i> sp.	28.6	35.4	0.0 ^b	98.6
B3P084	<i>Vishniacozyma</i> sp.	32.1	29.3	58.7	89.7

^aGrowth inhibition was tested on the *H. fraxineus* isolates P3 and HF23. *Significantly increased in comparison to the control *M. pulcherrima* (B3K065), which did not show antagonistic activity in dual cultures (growth inhibition rates: 28.4 and 15.8). The test was performed by Kruskal-Wallis one-way analysis of variance on ranks followed by pairwise comparisons with Dunn's method ($P < 0.05$). ^bDetection of the antagonistic isolate inside the recovered *H. fraxineus* mycelium or instead of the mycelium.

3.2.3. Rasprava

Kolonije gljivica koje se javljaju na lišću smatraju se barijerom za infekciju zaraznim vrstama koje prvo napadaju list. Te se kolonije bore s patogenom oko resursa, prostora, koriste antagonističko djelovanje parazitizam i ponekad induciraju prirodnu otpornost biljke. Pretpostavljeno je da epifiti i endofiti slično reagiraju na patogen te su korišteni uzorci iz oba staništa u kombiniranom pristupu (Regina Becker¹, Kristina Ulrich², Undine Behrendt¹, Michael Kube³ i Andreas Ulrich¹ 2020). Utvrđena je visoka prisutnost saprotrofskih kvasaca, pogotovo u filozofnim zajednicama. Kvasci dobro rastu koristeći se biljnim izlučevinama dok biljke koriste metabolite poput auksina i glikolipida koje proizvode kvasci. Kvasci također imaju antigljivični efekt te pridonose otpornosti biljke na patogene.

Iako je u filozferi utvrđena visoka koncentracija kvasaca u endofitnim zajednicama ipak su dominantne bile filamentozne vrsta kod kojih je najzastupljenija bila *A. pullulans*. Vrsta *A. pullulans* ovisno o okolišnim uvjetima može mijenjati svoj oblik između kvasca i micelija. Ostali često prisutni kvasci su bile *P. flavescens* i *V. carnescens*, a od filamentoznih vrsta česte su bile *Pyrenochaeta* spp. i *Cladosporium* spp.

Sastav gljivičnih zajednica kod tolerantnih i osjetljivih stabala je vrlo sličan, no ipak su otkrivene neke taksonomske jedinice i izolati koji imaju značajni utjecaj na zdravstveno stanje stabla. Uz *P. flavescens* koja se već koristi protiv plamenjače žitarica uzrokovane *Fusarium graminearum* Schwabe 1839, to su bili još neki taksoni i izolati grupe *S. strictum*. Visoku zaštitu pružaju i pripadnici roda *Papiliotrema*. Zbog svojih antibiotika i hidrolizirajućih enzima sojevi roda *Sarocladium* mogli bi se primijeniti za kontrolu patogena. Također *S. strictum* ima mikoparazitski učinak no ne primjenjuje se zbog svoje patogenosti za ljude.

Analizom genetskih markera utvrđeno je da su dvije skupine gljivica specifične za tolerantna stabla. To su kvasci i filamentozne gljivice. Kod kvasaca je pronađeno nekoliko izolata koji su uspješno reducirali širenje *H. fraxineus* do 50% ili su u potpunosti uspjeli ubiti jedan od sojeva patogena. Taj je efekt postignut sinergiskim djelovanjem enzima glukaze, kitinaze i proteaze. Mnogi sojevi *A. pullulans* sadrže enzime koji potiču lizu stanične stjenke patogenih gljiva i u kombinaciji s ostalim antimikrobnim sastojcima čine ovu vrstu vrlo efektivnom pri suzbijanju patogena.

U usporedbi s kvascima filamentozne vrste su bile učinkovitije u suzbijanju patogena. To potvrđuje i činjenica da su izolati roda *Cladosporium* uspješno inhibirali rast oba testirana soja *H. fraxineus* od 71 do 100% i da su uspješno smanjili vitalitet tog patogena. Kod izolata *Diplodia fraxini* (D1K016) i *Phomopsis velata* (B2K028) zabilježeno je fitopatogeno djelovanje.

Hanackova i dr. (2017) testirali su brojne endofite s jasena te pronašli usporedivo visoke stope inhibicije s *Botrytis cinerea* Pers. 1801 i *Phoma macrostoma* Mont. 1849. No, kod endofitnih gljivica uzetih s tolerantnih stabala *F. mandshurica* i *F. ornus* utvrđena je niža stopa antagonizma od 40-64%.

Tri izolata s najvišom stopom antagonizma pripadala su rodu *Cladosporium*. Još u potpunosti nije razjašnjena biologija antagonizma pripadnika ovog roda no smatra se da ima veze s mogućnošću nekih njegovih vrsta da parazitiraju na drugim gljivicama. Također s obzirom da su neki sojevi iz ovog roda patogeni za ljude treba biti garantirana njegova sigurnost prije upotrebe. Taj rod je ujedno i bio drugi najzastupljeniji rod kod *F. mandshurica*. Također je u bliskom srodstvu s rodom *Mycosphaerella* koji je bilo najzastupljeniji na toj vrsti jasena.

Kao što je spomenuto pri testiranju su bila korištena dva soja *H. fraxineus*, soj P3 i HF23. Soj P3 je bio osjetljiviji na izolate kvasaca dok je soj HF23 bio podložniji štetnom utjecaju izolata filamentoznih vrsta uključujući izolate iz roda *Cladosporium*. Patogen *H. fraxineus* također posjeduje veliku prirodnu raznolikost tako da bi se testovi antagonizma trebali provoditi s zaraženim peteljka jasena iz prirodnih sastojina jasena. Još nije poznato mogu li se ovim potvrditi rezultati *in vitro* testova. Također pri *in vitro* testovima ne može se uzeti u obzir odnos biljke domaćina i antagonista koji može pojačati ili reducirati željeni efekt.

Komparativnom je analizom osjetljivih i tolerantnih stabala utvrđeno da je sastav gljivičnih kultura između njih vrlo sličan. Samo je nekoliko gljivičnih grupa bilo prisutno u značajno većoj mjeri kod tolerantnih stabala, a to su uglavnom bili pripadnici *P. flavescens* i *S. strictum*. Smatra se da su te specifične grupe razlog više tolerancije na patogen. *In vitro* testovima otkriveno je da neki kvasci te osobito brzorastuće filamentozne gljivice imaju inhibirajući efekt na *H. fraxineus*. Izolati obje skupine bi mogli biti primijenjeni za suzbijanje bolesti, no trebalo bi provesti in plant testove da bi se procijenila njihova učinkovitost.

3.3. Primjena prirodnog antagonizma gljivica pronađenih u listincu

Budući da *Hymenoscyphus fraxineus* stvara apotecije na peteljka prošlogodišnjeg lišća u listincu jedna od opcija suzbijanja ovog patogena bi bila odstranjivanje listinca kao alternativa kemijskim sredstvima. Odstranjivane bi se moglo provoditi paljenjem ili kompostiranjem. Ove metode bi se mogle primijeniti u rasadnicima ili u urbanim sredinama, no u šumskim sastojinama su vrlo teško provedive. S obzirom na to, još jedna od alternativa je primjena prirodno prisutnih gljivičnih zajednica za biokontrolu patogena. Učinkovitost toga može se potvrditi činjenicom da su poznati neki endofiti poput *Boeremia exigua* (Desm.) Aveskamp, Gruyter & Verkley 2010, *Epicoccum nigrum* Link 1816, *Hypoxyton rubiginosum* (Pers.) Fr. 1849 i *Phoma macrostoma* Mont. 1849 koji mogu inhibirati rast *H. fraxineus*. U nastavku za metodu odstranjivanja listinca kompostiranjem za dugoročnu kontrolu tom metodom mogle bi se implementirati gljivične zajednice koje pospješuju dekompoziciju listinca. Prije nego se ova metoda upotrijebi kemijski sastav listinaca treba zadovoljiti određene uvjete. Da bi dekompozicija brže tekla povoljno je da je koncentracija dušika i fosfora u lišću viša, dok će viša količina lignina usporiti razgradnju (Melillo, Aber, Muratore 1982, Osono, Takeda 2005). Urea također pospješuje razgradnju listinca i sprječava formiranje apotecija *H. fraxineus* (Kowalski i Bilański 2021).

Same peteljke jasena puno su otpornije na dekompoziciju i zbog visokog sadržaja škroba stvaraju idealnu podlogu za rast gljivica.

Dalje će se raspravljati o rezultatima istraživanja provedenih u Poljskoj čiji je cilj bio proučiti sastav gljivičnih zajednica koje se nalaze u listincu jasenovih sastojina te ustanoviti imaju li inhibitorno djelovanje na *H. fraxineus*.

3.3.1. Metode i materijali

Lokacije

Uzorci su uzimani iz pet jasenovih sastojina koje su imale simptome zaraze *H. fraxineus*, starosti od 27 do 82 godine. Te su sastojine nalazile na jugu Poljske i bile su: Brody, Dynów, Miechów, Myślenice i Ojców. Sastojine su bile mješovite no jasen je činio od 10 do 80% ukupnih vrsta. Peteljke su sakupljane od 10. travnja do 8. lipnja 2017. Po sastojini je sakupljeno 180 peteljki, te su sljedeći dan u laboratoriju bile podijeljene u tri podgrupe od 60 peteljki i spremljen u sterilne kutije na 5°C. Svaka je podgrupa bila drugačije testirana (Kowalski i Bilański 2021).

Izolati i identifikacija

Uzorci podgrupe I. su bili korišteni za identifikaciju na temelju morfologije kolonija (boja, oblik, prisutnost stromatskih tvorevina, itd.). Peteljke su prvo bile sterilizirane u 96% etanolu te u 4%-tnoj otopini natrijeva hipoklorida i zatim su još jednom sterilizirane u etanolu. Nakon što su se peteljke osušile svaka je bila podjeljena na 12 jednakih dijelova i postavljena na MEA agarnu hranjivu podlogu, na dvije perijeve zdjelice koje su bile posebno označene, koja je sadržala 100 mg L-1 streptomycin sulfata da bi spriječila razvoj bakterija. Inkubacija je provedena na 20°C u periodu od 42 dana s provjerama svakih dva tjedna. Novi miceliji koji bi se pojavili bili su preneseni na sterilne hranjive podloge te su bili inkubirani 3-4 tjedna. Izolati su bili grupirani u morfotipove. Da bi se smatrala koloniziranim određena vrsta je morala biti izolirana s barem 1 od 12 dijelova peteljke.

Popis gljiva iz plodnih tijela na peteljkama

Ovaj dio istraživanja je proveden na peteljkama iz podgrupe II. i III., peteljke iz podgrupe II. bile su spremljene na 5°C te ubrzo nakon toga analizirane. Peteljke iz podgrupe III. bile su raspoređene na ograđenoj livadi pod krošnjama nekoliko stabala uz umjerenu vlagu te su nakon 10-14 dana bile proučene uz pomoć povećala. One na kojima su pronađena plodna tijela bile su transportirane u laboratorij u sterilnim kutijama na mikrobiološku analizu. One reprezentativne su bile pohranjene u herbarij dok je većina bila brojčano označena i ponovno odložene na livadu da bi razvila plodna tjela.

Za identifikaciju *H. fraxineus* kod podgrupe II. korištene su pseudoklerociji ili anamorfni oblik patogena, dok je kod podgrupe III. za identifikaciju patogena korištena prisutnost apotecija formiranih na pseudosklerociju. Za identifikaciju roda *Typhula* korištena je prisutnost bazidiokarpa ili prisutnost neprokljalih sklerocija. Za mikroskopsku analizu korišteni su ručno pripremljeni uzorci, po tri uzorka za svako plodno tijelo koje se proučavalo. Gljivice su bile determinirane do najnižeg taksona koristeći se mikrobiološkim ključevima i monografijom. Pokušalo se uspostaviti čiste kulture za svaki determinirani takson. Kulture pojedinih taksona kasnije su bile analizirane nukleotidnim sekvencama ITS područja molekule rRNK.

Ekstrakcija DNK, PCR i sekvenciranje

Da bi se potvrdili rezultati dobiveni na temelju morfoloških opažanja bilo je provedeno sekvenciranje amplificiranog ITS područja rRNK molekule.

DNK se ekstrahirao iz kultura starih 3 tjedna pomoću „Genomic Mini AX Plant Kit (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland)“. Fragmenti ITS područja su bili amplificirani u 25µL reakcijskoj smjesi. PCR amplifikacija je bila provedena u Labcyler thermocycler uz denaturaciju na 98°C u trajanju od 30 sekundi nakon čega je slijedilo 35 ciklusa od 5 sekundi na 98°C, od 10 sekundi na 52-64°C i 30 sekundi na 72°C. Konačna je elongacija trajala 8 minuta i bila je provedena na 72°C. Produkti PCR su bili obojani Midori Green DNK bojom pod UV svjetlom na 2%-tnoj agaroznoj podlozi. Amplificirani proizvodi su bili sekvencirani pomoću BigDye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit te su njihovi rezultati uspoređeni sa sličnim sekvencama iz BLAST baze podataka. Vrsta je bila determinirana u slučajevima podudarnosti 98%, dok je za one vrste kojima se nije mogao na ovaj način odrediti takson korištena filogenetska analiza.



Slika 14. Genomic Mini AX Plant Kit (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland) , izvor: <https://www.aabiot.com/en/genomic-mini-ax-plant>

Testovi dvojne kulture

Reprezentativni izolati iz podgrupe I. bili su podvrgnuti testovima antagonizma na dva soja *H. fraxineus*. Oba soja su brzorastuća i bili su nabavljeni 2017. iz dvije sastojine jasena na jugu Poljske. Za ispitivanje su na agarnu podlogu postavljena dva čepa s kulturama patogena na razmaku od 25mm, a uz rubove je postavljena kultura testirane gljivice. Pri ispitivanju je vršena i negativna kontrola s agarnim podlogama na kojima je bila nasađena samo kultura *H. fraxineus*. Inkubacija je provedena na 20°C u periodu od 3 tjedna bez prisustva svjetla. Nakon inkubacije bili su mjereni sljedeći parametri: radijalni rast *H. fraxineus* (Ri) i rast testirane gljivice (Rs) uzduž osi koja spaja središta kultura *H. fraxineus*, mjereno je radijalni rast kontrolne kulture *H. fraxineus* (Rc) i radijalni rast u gornjem i donjem dijelu testirane gljivice. Svi su parametri mjereni s točnošću do 1 mm. Stopa inhibicije je procijenjena po formuli „ $(Rc - Ri)/Rc \times 100$ and $(Rm - Rs)/Rm \times 100$ “.

Obzirom na prethodna istraživanja mogu se očekivati četiri različita rezultata: a) kolonije patogena i testirane gljivice će se susresti bez zone inhibicije; b) između kolonija će postojati zona inhibicije; c) testirane gljivice će prerasti koloniju patogena; d) patogen će prerasti testirane gljivice. Inhibicija je ocjenjena po principu f- nema redukcije patogena; a-inhibira do 25%; b-inhibira od 26-50%; c-inhibira od 51-75%; d- inhibira patogen preko 75%. u slučaju da je testirana kolonija u potpunosti prerasla koloniju *H. fraxineus* ona je bila ponovno uzorkovana i njeni su izolati bili opet testirani.

Analiza podataka

Razlika u sastavu gljivičnih zajednica s pet lokacija bila je analizirana pomoću Shannon diversity index (H') i Simpson's diversity indeks, dok je dominantnost neke vrste u zajednici bila određena Camargo metodom. Veza između učestalosti gljivica i njihovog podrijetla je bila analizirana pomoću analize glavnih komponenti. Da bi se ta analiza provela vrsta je morala biti zastupljena barem s 10% kod podgrupe I i s barem 5% kod podgrupe II i III. Koristeći se Marascuilo procedurom i istim podacima može se procijeniti statistička značajnost pojave određene gljivice u sastojini. Sličnost između gljivičnih zajednica s 5 sastojina bila je analizirana metodom grupe neponderiranih parova s aritmetičkom sredinom, a dobiveni podaci su bili grupirani na temelju Bray–Curtis indeksa sličnosti. Ponavljajući taksoni pronađeni na peteljicama lišća ili determinirani iz plodnih tijela bili su analizirani koristeći h Gephi visualization software v.0.9.2 u kombinaciji s Fruchterman– Reingold rasporedom. Svi su proračuni napravljeni koristeći Statistica v.12, PAST v.3.11 i Marascuilo proceduru u R software v.3.5.1.

3.3.2. Rezultati

Izolati s peteljki

Iz peteljki je uspješno bilo izolirano 2832 kulture iz toga je uspješno prepoznato 164 morfotipa. Kulture su se javlja više na bazi peteljke gdje su činile 72.2% mikrobiološkog sastava, dok su pri vrhu činile 66.7%. Za precizniju determinaciju taksona provedena je sekvenciranje ITS područja rRNK i precizno je determinirano 117 taksona. Od tih 117 taksona 27 ih je bilo klasificirano dominantima, a najučestaliji su bili: *Nemania serpens* (Pers.) Gray 1821, *Hymenoscyphus fraxineus*, *Alternaria* sp. 1, *Boeremia* sp., *Helotiales* sp. 1, *Epicoccum nigrum*, *Venturia fraxini* Aderh. 1897, *Fusarium* sp., *Fusarium lateritium* Nees 1816, *Nemania diffusa* (Sowerby) Gray 1821 i *Typhula* sp. 2. Izolati su pripadali trima koljenima. Najnižu zastupljenost je imalo koljeno *Mucoromycota* s 1.7% i predstavljali su ga taksoni *Mortierella* i *Umbelopsis*. S druge strane koljeno *Ascomycota* bilo je najzastupljenije s 85.5% te je obuhvaćalo oko 100 taksona kroz 19 redova. Najzastupljeniji redovi su bili *Pleosporales*, *Helotiales* i *Xylariales*. Koljeno *Basidiomycota* bilo je zastupljeno s 12.8% i sastojalo se od 15 taksona iz 6 redova. Najzastupljeniji taksoni iz ove skupine su bili *Typhula* sp., *Peniophora incarnata* (Pers.) P. Karst. 1889, *Agaricales* i *Russulales*.

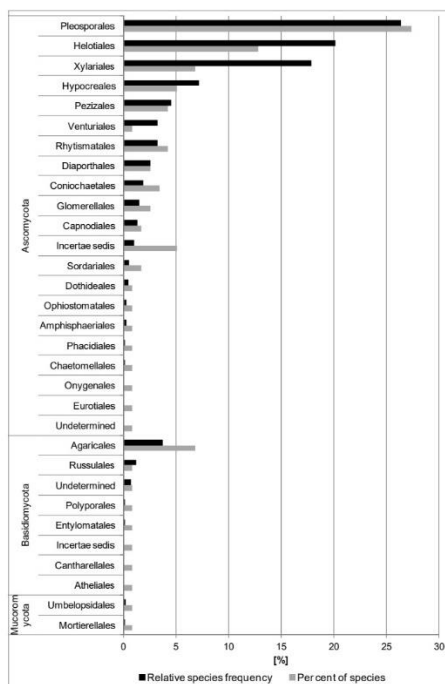


Figure 1. Frequency of fungi detected in situ on the previous year's leaf petioles of *F. excelsior*. Relative species frequency calculated as the ratio of the number of specimens in the order to all specimens $n = 1251$. Percent of species calculated as the ratio of the number of species in the order to all species $n = 117$.

Slika 15. Prisutnost gljivica na prošlogodišnjim peteljkama, izvor: <https://www.mdpi.com/1999-4907/12/10/1412>

18 taksona je bilo prisutno na svih pet lokacija na kojima je provedeno uzorkovanje dok ih je 35 bilo isključivo vezano za jednu sastojinu. Prema Shannonovom indeksu raznolikosti (H') i Simpsonovom indeksu raznolikosti (SDI), najveća raznolikost je bila prisutna u Dynówu s $H' = 3.67$ i SDI = 0.96. Najniža je raznolikost bila u Ojców u s indeksom SDI = 0.93 i u Brodyu s indeksom $H' = 3.31$.

Analizom glavnih komponenti lokaliteta su bili podijeljeni na temelju prisutnosti dominantnih vrsta. Drugom analizom glavnih komponenti lokaliteta Myslenice je bio odvojen od ostalih lokaliteta na temelju prisutnosti *Epicoccum nigrum* i ostalih dominantnih vrsta. Razlika u prisutnosti *Epicoccum nigrum* na lokaciji Myslenice i na lokacijama Ojców i Dynów bila je statistički podržana Marascuilo

procedurom. Slično tome prisutnost *Nemania serpens* ((Pers.) Gray 1821) bila je daleko veća na lokaciji Ojców dok je na Dynówu u izrazito visokom broju bila prisutna *H. fraxineus*. Analizom supojavljivanja gljiva iz izolata dobivenih iz peteljke, provedene pomoću Spearmanovim rang koeficijentom korelacije, ustanovljena su 233 statistički značajna odnosa te pet modula supojavljivanja. Prvi modul sastojao se od 16 taksona (*F. lateritium* i *N. diffusa*), drugi je sadržavao 21 takson (*E. nigrum*), treći 14 (*Boeremia* sp.), četvrti 16 (*Alternaria* sp.) i peti 14 (*Helotiales* sp. 1 i *H. fraxineus*). S drugim gljivama su se najčešće javljale vrste: *Cladosporium* sp., *Helotiales* sp., *Microsphereopsis* sp. i *Xylaria polymorpha* (Pers.) Grev. 1824. *Cladosporium* sp. i *Microsphereopsis* sp. su se javljale u podjenakoj mjeri u pozitivnoj i negativnoj korelaciji dok su *Helotiales* sp. i *Xylaria polymorpha* imale češće negativnu korelaciju. Ta negativna korelacija se odnosi na smanjivanje prisutnosti jedne svojte u prisustvu druge. Primjer takve negativne korelacije je smanjivanje *H. fraxineus* u prisustvu *Helotiales* sp..

In situ testovi podgrupe II i II

Analizom plodnih tijela koja su se razvila na peteljkaama determinirano je 45 taksona od kojih je 41 pripadao koljenu *Ascomycota* i 4 koljenu *Basidiomycota*. Svi taksoni iz koljena *Basidiomycota* pripadali su redu *Agaricales*. Svih 45 taksona je bilo kultivirano i podvrgnuto molekularnoj analizi. Od tih 45 taksona 23 su bila pronađena pri kultivaciji kultura iz podgrupe I. Najzastupljeniji je bio red *Helotiales* s 51% i imao je najveću raznolikost sa ukupno 17 vrsta. Na visoku raznolikost taksona je ukazivala i visoka raznolikost plodnih tijela na peteljkaama, koja je često bila praćena diskoloracijom peteljke. Također treba napomenuti i mogućnost gubitka plodnih tijela pojedinih taksona koja nastaju na vanjskoj strani peteljke zbog sitnih životinja koje mogu pojesti vanjski dio peteljke. 11 taksona je bilo klasificirano kao dominantno i njihova je zastupljenost bila od 5.2%-33.7%. među najzastupljenijima su bile: *Hymenoscyphus fraxineus*, *Venturia fraxini*, *Leptosphaeria* sp. 2, *Cyathicula fraxinophila* (Svrček) Baral 1993, *Typhula* sp. 2, *Hypoderma rubi* (Pers.) DC. 1805 i *Pyrenopeziza petiolaris* (Alb. & Schwein. ex Fr.) Nannf. 1932) Osm taksona je bilo prisutno u svim sastojinama dok je 13 bilo isključivo vezano za jednu sastojinu. Najviši stupanj raznolikosti je bio zabilježen na lokalitetu Ojców $H' = 2.82$ i $SDI = 0.91$, a najniži je stupanj bio na lokalitetu Miechów $H' = 1.99$ i $SDI = 0.79$. Analizom glavnih komponenti lokaliteti su bili podijeljeni s obzirom na prisutnost *H. fraxineus*. Drugom analizom glavnih komponenti lokalitet Ojców bio je odjeljen od ostalih na temelju prisutnosti vrste *Leptosphaeria* sp. 2 i ostalih dominantnih vrsta. Prisutnost *H. fraxineus* na lokaciji Miechów za razliku od onih na lokacijama Brody, Ojców i Dynów bila je statistički poduprta Marascuilo procedurom. Isto tako *Leptosphaeria* sp. 2 je bila prisutnija na Myslenice nego na lokaciji Ojców.

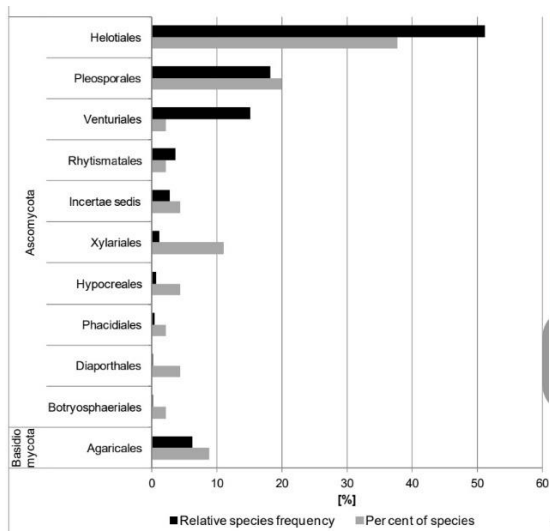


Figure 5. Frequency of fungi detected in situ from fruit bodies on the previous year's leaf petiole of *F. excelsior*. Relative species frequency calculated as the ratio of the number of specimens in the order to all specimens $n = 882$. Percent of species calculated as the ratio of the number of species in order to all species $n = 45$.

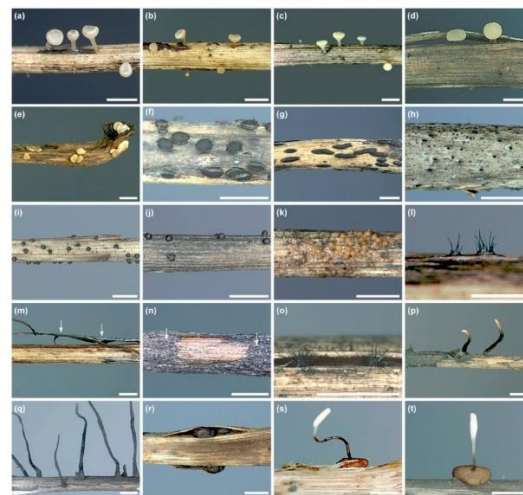


Figure 6. Fungal fruit bodies on the previous year's leaf petioles of *F. excelsior* in the litter, in 2017: (a–f) apothecia: a—*Cyathicula fraxiniphila*, (b) *Cyathicula* sp. 2, (c) *Hymenoscyphus conidatus*, (d) *Hymenoscyphus scutellus*, (e) Helotiales sp. 1, (f) *Pyrenopeziza petiolaris*, (g) *Hypoderma rubi*, hysterothecia and pycnidia, (h) *Paraophiobolus arundinis* pseudothecia, (i) *Leptosphaeria* sp. 2, pseudothecia, (j) *Leptosphaeria sclerotioidea*, pycnidia, (k) *Neonectria* sp. 2, perithecia, (l–n) *Venturia fraxini*, with setae lining the ostiolium of the pseudothecium (l), pseudothecia on the exfoliated periderm (m), pseudothecia on petioles with damage made by small fauna (n), (o) setaceous pycnidia of *Pyrenochaeta* sp., (p) anamorph of *Xylaria* sp. 1, (q) anamorph of *Xylaria* sp. 3, (r,s)—*Typhula* sp. 2, sclerotia (r) and carpogenic sclerotium (s), (t) *Typhula erythropus*, carpogenic sclerotium.

Slika 16. Prikaz vrsta gljivica determiniranih na temelju plodnih tijela na prošlogodišnjim peteljka, izvor: <https://www.mdpi.com/1999-4907/12/10/1412>

Iz dendograma nastalog na temelju Bray–Curtis indeksa može se vidjeti da su zajednice s lokaliteta Dynów i Miechów vrlo slične dok su se na lokalitetima Ojców, Brody i Myslenice razlikovale.

Od 202 peteljke zaražena *H. fraxineus* na njih 177 bilo je prisutno istih 26 vrsta. Peteljke na kojima su bile prisutne te vrste imale su svjetliju boju od onih na kojima je bio prisutan pseudosklerocij *H. fraxineus*. Na jednoj od peteljki *Cyathicula coronata* (Bull.) Rehm 1893) svoje je apotecije napravila na pseudoklerocijima *H. fraxineus*. Patogen *H. fraxineus* može na peteljka jasena koegzistirati s *V. fraxini*, no ne koegzistira na isti način kao s ostalim gljivicama. Pseudoklerocije formira subepidermalno te oni izlaze nakon deskvamacije epiderme i pri tome uklanjaju pseudotecije *V. fraxini*.

Supojavljivanje gljivica je imalo pozitivnu i negativnu korelaciju te je bilo statistički značajno u slučaju da je bilo pozitivne korelacije s *V. fraxini*. Visoka učestalost *H. fraxineus* bila je često povezana s prisutnošću gljivica *Leptosphaeria sclerotioidea* (Preuss ex Sacc.) Gruyter, Aveskamp & Verkley 2012, *Leptospora rubella* (Pers.) Rabenh. 1857 i *Paraophiobolus arundinis* Phukhams., Phook., Wanas., Camporesi & K.D. Hyde 2017.

Analiza dvojnih kultura

Od četiri tipa reakcija koje su se mogle očekivati pri interakciji *H. fraxineus* s izoliranim kulturama gljivica pojavile su se reakcije tipa a), b) i c), dok reakcija d) tipa nije bilo. Pri ovome su reakcije a) i b) tipa bile učestalije od onih c) tipa. Učestalost tipa reakcije nije ovisila o izolatu *H. fraxineus* koji je bio korišten. Za svaku testiranu vrstu korišteno je od 1 do 5 morfotipova te vrste, različiti morfotipovi su na početku imali različite interakcije no pod kraj istraživanja su se izjednačili.

Kod reakcija tipa a) veličina i oblik kolonije *H. fraxineus* je ovisilo o brzini širenja testirane gljivice. Kod reakcija tipa b) zona inhibicije je bila najčešće ispod 3 mm s tim da je kod nekih uzoraka primijećena zona inhibicije širine preko 16 mm. Ova širina je uočena kod *Coniochaeta angustispora* D. Hawksw. & H.Y. Yip 1981, *Cytospora pruinosa* (Fr.) Sacc. 1879, *Fusarium* sp., *Lanzia* sp. FeF26, *Malbranchea* sp.

Koje su imale zonu inhibicije širine 16 mm, te kod vrsta *Peziza ninguis* Donadini & Trimbach 1978, *Plenodomus* sp. 1, *Pseudo-coleophoma polygonicola* Kaz. Tanaka & K. Hiray. 2015 kod kojih je zona inhibicije bila široka 27 mm. Također bile su primijećene morfološke promijene kod *Hypoderma rubi* koja je na rubovima *H. fraxineus* uzrokovala smeđu pigmentaciju i *Lanzia* sp. FeF26 koja je uzrokovala nastajanje crnih mrlja unutar kolonije *H. fraxineus*. Reakcije tipa c) bile su prisutne kod 12 taksona. Reakcije ovog tipa odvijale su se kroz tri koraka: 1. značajna inhibicija *H. fraxineus*, 2. formiranje zone inhibicije, 3. koloniziranje zone inhibicije i dijelova kolonije *H. fraxineus*. *Hypholoma fasciculare* (Huds.) P. Kumm. 1871 i *Trichoderma viride* Pers. 1794 su u potpunosti uspjele kolonizirati i prerasti koloniju *H. fraxineus* te su iz njihovih kolonija uzeti izolati. Redukcija rasta kolonija *H. fraxineus* bila je određena usporedbom s kontrolnom skupinom. Stopa se redukcije najčešće kretala od 51 do 75% te je u nekim slučajevima i prelazila 75%. obzirom na stopu inhibicije taksoni su bili podijeljeni u dvije grupe: u prvu su smješteni oni koji su inhibirali rast od 26-50% i od 51-75%; u drugoj su skupini bili smješteni ostali taksoni. U 90% dvojnih kultura bilo je uočeno smanjene rasta saprotrofnih partnera prema *H. fraxineus*, a najčešće je iznosilo 26-50%.



Figure 9. Various types of interactions observed in dual cultures (MEA, 3 weeks, 20 °C). *Hymenoscyphus fraxineus* (HF1 or 2) from the left, test fungus on the right: (a–d) type A interaction, (a) *Hymenoscyphus fraxineus* (FeF164), (b) *Alternaria* 1 (FeF152), (c) *Microspheeropsis* sp. (FeF92b), (d) *Pyrenochaeta* sp. (FeF13), (e–f) type B interaction, (e) *Placidium lacerum* (F246), (f) *Plectosphaerella caucumerina* (FeF161b), (g) *Hypoderma rubi* (FeF203), (h) *Pleospora* sp. (FeF80), (i) *Paraphaeosporium flectu* (FeF109), (j) *Lanzia* sp. (FeF26), (k) *Malbranchea* sp. (FeF243), (l) *Pseudo-coleophoma polygonicola* (FeF201), (m–t) type interaction, (m) *Nemania diffusa* (FeF104), (n) *Nemania serpens* (FeF245), (o) *Rosellinia corticium* (FeF167), (p) *Rosellinia trisides* (FeF187) (with inhibition zone only partly covered, see text), (q) *Xylaria* sp. 1 (FeF97a), (r) *Xylaria polymorpha* (F30), (s) *Desmazierella acicola* FeF119, (t) *Hypholoma fasciculare* (FeF241).

Slika 17. Različite interakcije patogena i testirane gljivice, izvor: <https://www.mdpi.com/1999-4907/12/10/1412>

3.3.3. Rasprava

Na pet lokacija na kojima su sakupljeni uzorci utvrđeno je visoka raznolikost među vrstama kako kod čestih tako i kod rijetkih. Većina vrsta je pripadala koljenu *Ascomycota* te su se uz njih javljali i predstavnici *Basidiomycota* i u manjoj mjeri *Mucoromycota*. Visoka se prisutnost predstavnika može objasniti činjenicom da su prisutniji u ranijim fazama dekompozicije listinca dok su u kasnijim fazama dekompozicije češći predstavnici *Basidiomycota*.

Metodom izolacije iz agar pronađeno je više vrsta nego in situ metodama koje su se temeljile na prisutnosti plodnih tijela. No u in situ prisutnost nekih vrsta poput *Cyathicula fraxinophila* (Svrček) Baral

1993 i *Leptosphaeria* sp. 2 je bila veća nego kod primjene metoda izolacije iz agara. Ova pojava bi mogla biti rezultat potiskivanja dominantne vrste ili primjene dezinfekcijskih sredstava.

Od 45 vrsta otkriveni *in situ* metodom 23 su bile prethodno otkrivene izolacijom iz kultura na agaru. Tako da je ukupan broj vrsta otkrivenih na prošlogodišnjim peteljka iz listinca bio 139. Razlog za manji broj vrsta otkriven primjenom *in situ* metode može se pripisati činjenici da se metoda bazira na prisutnosti plodnih tijela, a neke gljivice na proizvode plodna tijela ili ih ne proizvode na peteljka. Također pri *in situ* metodi prevladavati će kvasci.

Unutar *Ascomycota* raznolikost je bila velika s oko 20 redova od kojih je najzastupljeniji bio red *Pleosporales*. Predstavnici tog reda česti su i na živom lišću jasena te pred kraj vegetacije prelaze na saprotrofski način života. Najčešći potencijalno patogeni predstavnik *Ascomycota* bila je *Venturia fraxini*. Ova vrsta u povoljnim uvjetima može uzrokovat slabljenje stabla i prerano otpadanje lišća, no u nekim slučajevima može živjeti na stablima u asimptomatskom obliku. Ranija kolonizacija lišća ovom vrstom može pridonijeti privremenoj zaštiti od *H. fraxineus* s obzirom da njena stopa antagonizma pri testovima nije bila najviša. Međutim *Boeremia exigua* (Desm.) Aveskamp, Gruyter & Verkley 2010 i *Cytospora pruinosa* (Fr.) Sacc. 1879 su bili također česti potencijalni patogeni s jakim antagonizmom za *H. fraxineus*.

Većina vrsta koje su bile pronađene na peteljka bile su saprotrofi te su dolazili iz rodova *Cyathicula*, *Hypoderma*, *Hymenoscyphus* i *Pyrenopeziza*. Prisutnost vrsta iz ovih rodova može se povezati s vremenom njihove fruktifikacije koja se poklapa s periodom u kojem otpada lišće jasena.

Pripadnici *Basidiomycota* detektirani na peteljka obavljaju različite ekološke funkcije poput pripadnika *Typhula* koji su saprotrofi i doprinose dekompoziciji biljnih ostataka. Ovi se saprotrofi obično mogu pronaći ujesen. Pripadnici rodova *Marasmius*, *Mycena*, *Clitocybe* ili *Collybia* obično su povezani s konačnim fazama dekompozicije te su kao takvi rijetki na prošlogodišnjim peteljka. *Fellozyma* sp. i *Tilletiopsis washingtonensis* Nyland 1950 bili su predstavnici basidiomikotnih kvasaca te su bili sporadično raspoređeni na peteljka u različitim fazama dekompozicije.

Dvojnomo analizom kultura saprotrofa i kultura *H. fraxineus* ustanovljeno je da saprotrofi mogu biti vrlo učinkoviti antagonisti. Poznato je da *H. fraxineus* proizvodi različite metabolite koji su miko- i fitotoksični. Pomoću tih metabolita inhibira kolonizaciju peteljka ostalim gljivicama. Učinkovitost inhibicije varira no uglavnom uspješno reducira micelji većine saprotrofa. Svi saprotrofi također inhibiraju *H. fraxineus* tako da inhibicija ovisi o brzini rasta saprotrofa i međusobnom odnosu s patogenom. Svrha je dvojnomo analize kultura bila otkriti strategije koje gljivice primjenjuju da bi prve kolonizirale peteljke i osigurale si hranjive tvari potrebne za život. Jedna od ovih skupina su bile brzorastuće gljivice (*Alternaria* spp., *Chromelosporium* sp., *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds 1965, ...) koje su imale jaku inhibiciju na *H. fraxineus*. Za vrijeme ranijih faza kolonizacije mogu biti dominantne. Brzim rastom kompenziraju spori metabolizam. U kasnijim fazama mogu imati visoku stopu antagonizma omogućenu proizvodnjom metaboličkih inhibitora i mikoparazitizmom. Najčešći rezultat dvojnomo kultura je bilo formiranje zone inhibicije. Najbolje rezultate tj. najširu zonu inhibicije su producirali *Malbranchea* sp. i *Pseudocoleophoma polygonicola* Kaz. Tanaka & K. Hiray. 2015. *Coleophoma empetri* (Rostr.) Petr. 1929 srodna je vrsta *P. polygonicola* koja proizvodi jake antifungalne tvari te se smatra da *P. polygonicola* ima slična svojstva. Ostali saprotrofi koji su proizveli zonu inhibicije također su proizvodili metabolite koji su djelovali antifungalno. *Aureobasidium pullulans* (de Bary & Löwenthal) G. Arnaud 1918 proizvodi aureobazidine koji razgrađuju stanične stijenke i pridonose lizi

hifa patogena. *Coniochaeta* proizvodi antibakterijske i antifungalne koniosetine i koniohetan-a. *E. nigrum* proizvode flavopin, epikorazin i epipiron koji razgrađuju stanične stijenke i razgrađuju hife patogena. Derivati ove vrste se već primjenjuju u proizvodima za biokontrolu patogena. *Fusarium lateritium* Nees 1816 proizvodi antifungalne seskviterpene.

Samo je nekoliko vrsta u potpunosti preraslo koloniju *H. fraxineus* što ukazuje na njihov potencijal za antagonizam u prirodi. Najjači efekt su imale *Clonostachys rosea* (Preuss) Mussat 1901, *Trichoderma viride* Pers. 1794, *Nemania*, *Rosellinia*, *Xylaria*, *Hypholoma fasciculare* (Huds.) P. Kumm. 1871 i *Peniophora incarnata* (Pers.) P. Karst. 1889. Re-izolacijom iz kolonija koje su prerasle *H. fraxineus* potvrđeno je da su je uspješno i zamijenile. Mada je na MEA agarnim podlogama kolonija *H. fraxineus* bila uspješno zamijenjena, u slučaju da je patogen okružen pseudosklerocijem to bi bilo znatno teže. Znak uspješne zamijene bi bila pojava plodnih tijela saprotrofne gljive na tim pseudosklerocijima.

In situ istraživanima otkriveno je da 50% vrsta pronađenih na peteljkaama može ograničiti rast *H. fraxineus*. Međutim većini tih vrsta jasen nije prirodni domaćin te se one javljaju na nizu vrsta drveća grmlja i u nekim slučajevima zeljastog bilja. Također neke od tih vrsta su izrazito fitopatogene poput *Discohainesia oenotherae* (Cooke & Ellis) Nannf. 1932, *Leptosphaeria sclerotioides* (Preuss ex Sacc.) Gruyter, Aveskamp & Verkley 2012 i *Verticillium dahliae* Kleb. 1913.

Zaključak

Odumiranje poljskog jasena uzrokovano patogenom gljivom *Hymenoscyphus fraxineus* u Europi je od ranih 90-tih ozbiljan problem. Infekcija stabala ovom gljivicom najvjerojatnije znači i propast čitave sastojine. Bolest se vrlo brzo širi askosporama koje raznosi vjetar. Te askospore mogu biti vrlo daleko transportirane na taj način no ne uzrokuju zarazu ako su u malim količinama. Bez obzira na te male količine pasivne klopke mogu detektirati prisutnost ovih askospore i time nam pružiti vrijedne informacije koje se mogu koristiti za izradu strategije suzbijanja bolesti prije nego se uspostavi zaraza. Također primjena sustava klopki u rasadnicima mogla bi se pokazati vrlo efektivnom u slučajevima kad je bolest u asimptomatskom obliku, zaražene sadnice ne bi bile korištene za pošumljavanje već bi se uništile. Još jedna korisna informacija koju bi dobili iz klopki je DNK patogena. Pomoću te informacije moguće je odrediti smjer iz kojeg zaraza dolazi.

Kod usporedbe sastava gljivičnih zajednica na tolerantnim i osjetljivim stablima jasena ističu se dvije vrste koje su prisutne u visokoj količini kod tolerantnih stabala. To su *Papiliotrema flavescens* (Saito) Xin Zhan Liu, F.Y. Bai, M. Groenew. & Boekhout 2015 i *Sarocladium strictum* (W. Gams) Summerb. 2011 i one igraju važnu ulogu u toleranciji stabla na zarazu patogenom bilo visokom kompeticijom ili induciranjem sistematske rezistentnosti stabla. Također kao efektivni inhibitori *H. fraxineus* pokazali su se i neki kvasci te brzorastuće filamentozne vrste.

Jedna od najvažnijih faza u životnom ciklusu *H. fraxineus* je njeno prezimljavanje u listincu i formiranje plodnih tijela na prošlogodišnjim peteljkaama idućeg ljeta. Pri tome joj je najveći problem prave vrste koje pokušavaju kolonizirati te peteljke prije nje. Većina tih vrsta dolazi sa stabala koja rastu u sastojinama jasena te im on nije primarni domaćin. Većina tih vrsta je antagonistički usmjerena prema *H. fraxineus*, te su pri testovima u dvojnim kulture neke u potpunosti uspjele uništiti kulture *H. fraxineus*. Derivati nekih vrsta poput *Coniochaeta* sp. se već primjenjuju u izradi za kontrolu ovog patogena.

Za primjena prirodnog antagonizma vrsta izoliranih s lišća tolerantnih stabala i iz prošlogodišnjih peteljki u svrhu biokontrole ovog patogene potrebna su daljnja istraživanja. Inicijalna istraživanja i testovi inhibicije na hranjivim podlogama daju pozitivne rezultate za određene vrste, no ne znamo kako bi introdukcija novih vrsta ili povećanje koncentracije postojećih utjecalo na stabla domaćine. Također većina ovih vrsta bila je izolirana iz sastojina običnog jasena, te je nepoznato u kojoj bi se mjeri mogle primijeniti na sastojinama poljskog jasena.

Literatura

Baral, HO., Queloz, V., Hosoya, T., 2014: *Hymenoscyphus fraxineus*, the correct scientific name for the fungus causing ash dieback in Europe, *IMA Fungus*. (1):79-80., Exeter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4107900/>

Barić, L., Županić, M., Pernek, M. i Diminić, D. (2012). Prvi nalazi patogene gljive *Chalara fraxinea* u Hrvatskoj – novog uzročnika odumiranja jasena (*Fraxinus* spp.). *Šumarski list*, 136 (9-10), 461-468, Zagreb, https://moodle.srce.hr/2022-2023/pluginfile.php/6912899/mod_resource/content/1/Chalara_fraxinea_%C5%A0umarski_list.pdf

Becker, R., Ulrich, K., Behrendt, U., Kube, M., i Ulrich, A., 2020: Analyzing Ash Leaf-Colonizing Fungal Communities for Their Biological Control of *Hymenoscyphus fraxineus*, *Front. Microbiol.*, 11, 590944. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.590944>

Cleary, M., Nguyen, D., Marčiulyrienė, D. *i dr.*, 2016: Friend or foe? Biological and ecological traits of the European ash dieback pathogen *Hymenoscyphus fraxineus* in its native environment, *Sci Rep* 6, 21895, London <https://doi.org/10.1038/srep21895>

Diminić, D., Kranjec Orlović, J., Milotić, M., 2020: Uzročnici bolesti poljskog jasena, OBNOVA I ZAŠTITA POPLAVNIH ŠUMA POSAVINE; Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 189-236, Zagreb

Fones, H., Mardon, C. i Gurr, S., 2016: A role for the asexual spores in infection of *Fraxinus excelsior* by the ash-dieback fungus *Hymenoscyphus fraxineus*, *Sci Rep* 6, 34638, London <https://doi.org/10.1038/srep34638>

Franjić, J., Škvorc, Ž., 2020: Poljski jasen, Šumsko drveće i grmlje Hrvatske, Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, Zagreb (516 str.): 234-235

Grosdidier, M., Iosif, R., Husson, C., Cael, O., Scordia, T., Marçais, B., 2018: Tracking the invasion: dispersal of *Hymenoscyphus fraxineus* airborne inoculum at different scales, *FEMS Microbiology Ecology*, 94, <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy049>

Kowalski, T., Bilański, P., 2021: Fungi Detected in the Previous Year's Leaf Petioles of *Fraxinus excelsior* and Their Antagonistic Potential against *Hymenoscyphus fraxineus*. *Forests*. 12(10):1412. <https://doi.org/10.3390/f12101412>

Landolt, J., Gross, A., Holdenrieder, O., Pautasso, M., 2016: Ash dieback due to *Hymenoscyphus fraxineus*: what can be learnt from evolutionary ecology?, *Plant Pathology An International Journal* edited by the British Society for Plant Pathology, 65, 1056-1070, <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ppa.12539>

Mikac, S., 2020: Utjecaj klimatskih čimbenika na rast poljskog jasena, EKOLOGIJA, OBNOVA I ZAŠTITA POPLAVNIH ŠUMA POSAVINE; Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 11-42, Zagreb

Ugarković, D., Oršanić, M., 2020: Odnos stanišnih i strukturnih čimbenika prema odumiranju stabala poljskog jasena (*Fraxinus angustifolia* Vlah) i hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.), OBNOVA I ZAŠTITA

POPLAVNIH ŠUMA POSAVINE; Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 43-100, Zagreb

<https://hrast.sumfak.hr/~dendrolo/atlas/063b.htm>

<https://www.daera-ni.gov.uk/articles/chalara-dieback-ash>

<https://www.cornwall.gov.uk/environment/trees-hedges-and-woodlands/tree-and-woodland-management/how-to-identify-ash-dieback-disease/>

https://en.wikipedia.org/wiki/Hymenoscyphus_fraxineus