

Jasenov rak i njegov uzročnik

Škorić, Vladimir

Source / Izvornik: **Glasnik za šumske pokuse: Annales pro experimentis foresticis, 1938, 6, 66 - 97**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:108:327250>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-28**



Repository / Repozitorij:

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



PROF. DR. VLADIMIR ŠKORIĆ:

JASENOV RAK I NJEGOV UZROČNIK*

(The ash-canker disease and its causal organism)

SADRŽAJ (SUBJECT-MATTER):

- 1) Uvod — Introduction.
- 2) Pregled literature — Review of literature.
- 3) Opis bolesti — Symptoms of the disease.
- 4) Izolacija bakterije i infekcioni pokusi — Isolations and inoculation experiments.
- 5) Morfologija i ponašanje organizma u kulturi — Morphology and cultural characteristics of the organism.
- 6) Upoređenje jasenove bakterije sa maslinovom i oleandrovom bakterijom — Comparison of ash-canker, olive-tubercle and oleander-tubercle organisms.
- 7) Patološka histologija — Pathologic histology.
- 8) Širenje i raznošenje bolesti — Spread of the disease.
- 9) Obrana — Treatment of the disease.
- 10) Literatura — Literature cited.
- 11) Zaključak — Summary:

1. Uvod

Jasenov rak je dosta česta bolest u raznim zemljama, pa je poznato njegovo pridolaženje u Austriji, Njemačkoj, Italiji, Francuskoj, Engleskoj i Nizozemskoj. Vlastita opažanja u našoj zemlji brzo su me uvjerila, da dolazi i u nas, a šta više njegova je pojava u našim krajevima veoma česta i štete koje prouzrokuje često su puta veoma znatne. Ta se bolest nalazi na jasenu i u zagrebačkoj okolini, no kako ovdje jasen dolazi tek mjestimično, to je i oboljenje ograničeno, no ipak dovoljno obilno, da je moglo poslužiti za radove na ispitivanju te bolesti. Prigodom istraživanja uzroka sušenja hrastovih šuma imao sam prilike, da prodem brojne jasenove sastojine

*) Najveći dio ove studije bio je izvršen za vrijeme, dok je pisac bio kao gost na radu u Fiziološkom paviljonu Botaničkog zavoda Filozofskog fakulteta, te stoga duguje posebnu hvalu predstojniku zavoda g. prof. Dru V. Vouku za iskazanu mu gostoljubivost.

dijelom čiste, a ponajčešće mješovite sastojine, koje leže na području zagrebačke direkcije šuma, druge banske imovne općine, gradiške i brodske imovne općine, te sam tako imao prilike, da i ovdje svuda ustanovim pridolaženje tog oboljenja sad u jačoj, a sad u manjoj mjeri. Dapače se našlo i slučajeva (Žutica), gdje su čitave jasenove sastojine u razvoju zaostale kao posljedica te bolesti, pa je i u svim tim krajevima sabran obilan materijal za istraživanje. Značajno je pri tom, da su jače bolesti podvržena stabla u gusto sklopljenim sastojinama, i na mjestima gdje je zračna vlaga veća, pa je tako bolest nađena na jasenu u vlažnim uvalama i u Sloveniji. Osobita karakteristika te bolesti jest i u tom, da se oboljela stabla nalaze redovno u grupama, a razlozi za takav način pridolaženja biti će objašnjeni u kasnijim razlaganjima. To dosta znatno raširenje bolesti u našim krajevima a isto tako mnoga sporna pitanja u vezi sa postankom i razvitkom te bolesti bila su razlogom, da je moje nastojanje išlo za tim da sa svoje strane nešto doprinesem boljem poznavanju te bolesti.

2. Pregled literature

Prvi, koji je zapazio jasenova raka, bio je Ratzeburg (10, 11) pa je tim osebnim tvorevinama nadjenao ime »Eschenridenrosen«, što on i opravdava time, jer rasparani rubovi raka i njihov veliki broj podsjeća po obliku ponešto na ružu, no on i sam priznaje da je to možda previše pjesničko ime. On doduše u tim tvorevinama nije nalazio nikakvih insekata, pa njihov postanak nije niti dovodio s njima u vezu, već su to učinili istom kasnije neki drugi istraživači. Po mišljenju istoga mogle bi te šupljine, koje se u tim tvorevinama nalaze poslužiti kao skrovište insektima. Niz godina kasnije prikazao je tu bolest i Sorauer u svom atlasu biljnih bolesti Tabla XXXVII, te po svemu izgleda, da se i slika i njegov opis potpuno slažu sa onim od Ratzeburga, no Sorauer već smatra da su te tvorevine posljedak napada jedne bakterije, što jasno proizlazi iz opisa, kojim je popraćena slika u spomenutom atlasu. Meni doduše nije bilo moguće da dobijem uvid u originalni atlas, no nije to bilo niti potrebno, jer se reprodukcija te table kao i teksta nalazi u Tubeufa (18). Detaljnija istraživanja o istoj bolesti objelodanio je samo nešto kasnije Noack (6), koji prikazuje razne razvojne stadije raka, opisuje položaj raka na granama i deblu, a u njegovom radu nalazimo i mikroskopske slike o izgledu bakterije, njezinu smještaju u staničju kao i utjecaju na zaraženo staničje. On postavlja već mnogo određeniju tvrdnju gledom na kauzalnu vezu između bakterije i spomenutog oboljenja, no on-

u tu svrhu ne pruža potreban dokaz, a nije ga dao niti kasnije, i ako je to u radu o kojem je ovde riječ napose napomenuto. Čini se, da je baš ta okolnost, što nije tu bolest sam proizveo putem umjetne infekcije, bila razlogom, da je sa istim organizmom dovodio u vezu i deformacije jasenovih ucvasti za koje davno znamo, da im je uzročnik grinja *Phytoptus fraxini* Nal.

Mnogo određenije mišljenje o uzročniku jasenova raka imade *Vuillemin* (20—23), koji navodi da je bakterija uzročnik te bolesti identična sa *Bacillus Oleae* Trev. odnosno prema novom nazivu *Bacterium Savastanoi*, koji je poznat kao uzročnik šuge na maslini. Isti navodi, da gljiva *Chaetophoma oleacina* omogućuje prodor bakterije u staničje. Ipak se ne može utvrditi iz objelodanjenih radova istog autora na čemu osniva on svoju tvrdnju o identitetu uzročnika jasenova raka i maslinove šuge, jer po svemu izgleda, da nije izvršio niti izolacije organizma, a pogotovo nije vršio infekcije. Možda je došao do tog zaključka samo na toj osnovi, što su maslina i jasen u blizom srodstvu, jer drugih dokaza nije pružio.

Više svijetla u to pitanje unesao je *E. F. Smith*, (15, 16), koji je već 1913. istraživao materijal iz blizine Wiena, te je istovremeno za vrijeme istraživanja o maslinovoj šugi u zajednici sa *N. Brown* izvršio i izolacije bakterije iz jasenovog raka. Izučavanjem te bakterije u kulturi došao je do uvjerenja da je ta bakterija veoma srodna sa *Bacterium Savastanoi*, iako nije baš identična. On je vršio sa istim organizmom i infekcije pokuse na evropskom jasenu, američkim jasenima i maslini. Infekcija je uspjela na američkim vrstama jasena, no bila je ipak najizrazitija na evropskom jasenu, a na maslini nije nastupila nikakva promjena, znak da ta bakterija nije patogena za maslinu. Iz svih tih razloga bio je *Smith* već tada sklon smatrati tu bakteriju varijetetom maslinove bakterije. Pripominjem da je *C. O. Smith* u (13) uspjelo sa bakterijom sa masline izazvati hipertrofiju na nekim američkim vrstama jasena, no te su tvorevine i po obliku, a i po anatomskoj građi odgovarale onima na maslini, a nisu imale sličnosti sa tvorevinama opisanim na jasenu.

Tako se je s jedne strane postepeno među biljnim patolozima iskristalizovala misao o bakterijskoj naravi te bolesti, pa kako se vidi bio je i organizam uzročnik bolesti već prilično identifikovan, no zoolozi pošli su u tom pogledu drugim putem, te su spominjanog raka dovodili u vezu sa regeneracijonim glodanjem likotoča *Hylesinus fraxini* Fabr.

Poznato je već od *Pfeilovih* vremena, a kasnije potvrđeno i od *Ratzeburga*, da često puta glode savršeni insekat koru da se njome prehrani, a *Nördlinger* (7, 8) navodi,

da je to osobito često na mjestima, gdje se od glavne grane odvajaju postrane grane. Premda Ratzeburg nije dovodio ni u kakvu vezu postanak jasenovog raka sa regeneracijonim glodanjem jasenova likotoča, to su se kasniji istraživači razilazili u tom pogledu, te neki drže (Henschel 4) da su te tvorevine nastale uslijed regeneracijonog žderanja spomenutog insekta. Dapače i istraživači kao Judeich i Nitsche (5), koji su katkad pravilno rasuđivali stvar, dovodili su kadšto evidentnog jasenovog raka u vezu sa regeneracijonim žderanjem. Istom je Geyr (3) pokazao da jasenov likotoč svojim žderanjem izazivlje na napadnutom mjestu pojačanu diobu staničja kore, no to dovodi u najboljem slučaju do kraštavosti, a nikad do tvorbe raka, pa je prema tome isključeno, da bi insekti bili uzrokom raka. Taj spor bio je povodom, da je i Stapp (17) istraživao jasenovog raka, no njemu nije bilo moguće izolirati bakteriju, koja bi umjetnom infekcijom izazvala raka, iako je izolirao niz baterijskih organizama sa kojima je vršio infekcije. Stoga je došao na misao, da nije uzrok tog raka bakterija, već da je uzrok istog jedna *Nectria*-vrsta, čije se hife nalaze u rakastim tvorevinama. Što je uzrokom negativnog rezultata Stappovih istraživanja dade se donekle zaključiti po tom, što je njegov materijal poticao od starih rakastih tvorevina u kojima se nalazi veliki broj saprofitских bakterija, koje lako prerastu parasita, čiji je razvoj spor, a to biva pogotovo slučaj, kad se primjeni metoda izolacije koju je upotrebio taj istraživač.

Kako je Richteru (12) uspjelo iz jasenova raka izolirati gljivu *Nectria galligena* Bres. var. major Wollenw, to je to ponovno oživilo mišljenje da je ta gljiva uzročnik tih promjena i ako on nije pokušao, da infekcijom sa tom gljivom proizvede zarazu na jasenu, a osim toga su i drugi njegovi rezultati međusobno u protuslovlju.

Nesumnjivo je međutim, da i jasen biva kadšto napadnut od *Nectria galligena* Bres. var. major Wollenw, što se najbolje vidi po tom da se na nekim rakastim tvorevinama nalaze obilno periteciji te gljive, a nutrina je ispretkana sa hifama gljive. Stoga je Van Vliet (19) pokušao, da potraži razlike u izvanjskoj morfologiji kao i u anatomskoj građi rakova, koji su nastali djelovanjem bakterije odnosno gljive. Kao najvažniji kriterij za prosuđivanje bakterijskog raka nalazi ovaj istraživač prisutnost šupljina u kori, koje su pune bakterija. Mimo toga ističe razlike u vanjskoj morfologiji, no i okolnost da se bakterijski rak nalazi na granama i deblu, a onaj uzrokovan gljivom na granama, a na deblu samo u veoma mladih stabala. Što se tiče anatomske građe nalazi se i tu dosta razlika u reakciji biline na napadaj bakterije i gljive, no kadšto

se ta razlika ponešto gubi, te izgleda kao da je bakterijom izazvani rak kasnije napadnut i od gljive. Usljed toga nestaje oštrija razlika između obe tvorevine, no i u tom slučaju vide se jasno lakune pune bakterija, a i obilje hijalnih hifa gljive, koje su ispreplele stanovite stanice.

Kako su svôjevremeno istraživanja o bakterijskom raku izvršena od E. F. Smith i N. Brownove bila tek mimogred opisana, to je nakon Smithove smrti Brownova (1) objelodanila nešto detaljniji prikaz tih istraživanja. U tom radu iznesene su morfološke i kulturne osobine organizama sa jasena, te je izvršeno upoređenje sa maslinovom bakterijom. Isto tako su prikazani infektivni pokusi na evropskom jasenu, američkim vrstama jasena i maslini, koji su pokazali da spomenuta bakterija zaražava osim evropskog (*F. excelsior*) i američke jasene, no da ne može inficirati maslinu. Konačno nakon svih tih izlaganja dolazi do zaključka, da je bakterija izolirana iz jasenovog raka doduše slična onoj sa masline, ali postoje među njima i razlike, koje po mišljenju istog pisca opravdavaju da se istu smatra varijetatom maslinove bakterije, te joj je i dala ime *Bacterium Savastanoi* Smith var. *fraxini* Brown.

U posljednje vrijeme izašlo je jedno saopćenje D' Oliveira (2) u kojem se iznosi da su infektivni pokusi sa *Bacterium Savastanoi* i njegovim varijetatom *fraxini* pokazali da nema nijedne biline, koju bi zarazila oba organizma, te ako se uz to uvaži činjenica da prvi uvijek izaziva tipične čvorove (tuberkule), a drugi samo raka, mišljenja je da bi trebalo revidirati shvaćanje, da je ovaj posljednji samo varijetet prvoga.

Konačno je Tubeuf (18) dao pregled oboljenja, koje izazivaju bakterije na maslini, cirbelju i jasenu, kao i promjene izazvane na jasenu od *Nectria galligena* i jasenovog likotoča. Pri tom iznosi nešto i vlastitih opažanja kao i prikaz anatomske građe jasenovog raka, te veoma sumarna opažanja o izolaciji organizma uzročnika raka.

3. Opis bolesti

Oboljela jasenova stabla veoma su lako zamjetljiva, jer je broj rakavih mjesta bilo na deblu bilo na granama obično veoma velik, a njihova vanjšina (izgled) upravo napadno izobličena. Što se tiče raspodjele raka na jasenu treba istaknuti, da u tom pogledu postoji dosta velika raznolikost. Iako se ponajčešće nalazi stabla u kojih se rakasta mjesta nalaze istovremeno i na granama i na deblu (Tabla I.) to ipak nije rijedak slučaj da nalazimo takva u kojih je deblo potpuno čisto, a grane u krošnji potpuno zaražene i to tako jako da postepeno djelovanjem raka odumiru. Događa se da nademo i takva stabla u kojih se rakaste tvorevine nalaze gotovo isključivo na deblu

i ako je posljednji slučaj dosta rijedak. Kada bolest jače zahvati jasenove u ranoj mladosti lako se dogodi da takva stabla toliko zaostanu u razvoju i budu potpuno patuljasta, grmolika i razgranana od zemlje. Ona su tek koji metar visoka uprkos toga, što bi kraj te starosti morala biti već i do desetak metara visoka. Sam položaj rakastih mjesta na granama je često veoma karakterističan, jer ih nalazimo u blizini ili uokolo brazgotina, gdje se nalazilo lišće, a kako je u jasena dekusiran položaj listova, to se nalaze u prvi čas i rakaste tvorbe na isti način raspodjeljene. Ipak se ta slika povremeno gubi nastankom novih rakova u internodiju, bilo uslijed novih infekcija bilo na taj način što nastaju sekundarni rakovi. Ta se pravilnost poredaja pogotovo gubi onda kada se nagomilavanjem rakova ovi međusobno stapaju i zahvataju čitave dijelove grana odnosno debla. Ipak je čest slučaj, da se rakasta mjesta nalaze gotovo isključivo samo u internodijima, te je njihov poredaj tek u toliko pravilan, što se često nalaze jedan ispod drugog, a to je kako ćemo kasnije vidjeti u vezi sa načinom širenja te bolesti.

Kad je rak potpuno razvit tad je njegov izgled ponešto raznolik, pa možemo razlikovati u glavnom dva tipa i to bradavičasti rak i upali rak. Dakako da su ta dva ekstremna tipa međusobno povezana prelaznim formama. Iako sam i u nas kadšto nalazio bradavičasti tip raka, to je ipak bio najčešći upali rak, a dosta puta nalazio sam i onaj prelaznog tipa. Bradavičasti tip pokazuje napadno zabreknuće s one strane, grane gde nastaje, a što je naročito značajno čitav se sastoji od većih ili manjih bradavica, koje su među-sobno u dubinu drva odvojene pukotinama smeđeg ruba. Površina im je prekrivena više ili manje posmedelom ili crnkastom korom, a na prerezu iste moći je zamjetiti lupom svjetlo smeđe pježice i linije, no također male pukotine u kojima se nalaze bakterije. Presjek grana na takvom mjestu pokazuje ekscentričnu građu drva, te su godovi na strani raka napadno deblji nego na suprotnoj zdravoj, tek što su ispresječeni prije spomenutim radijalnim pukotinama.

Obilniji materijal otvorenog raka omogućio mi je točnija opažanja o njegovom razvoju, jer sam osim starih potpuno razvitih stadija nalazio i sve mlade stadije. (Tabla II i III). Kod postanka ovog tipa zapaža se ponajprije da na mjestu nastajanja raka kora nabrekne i poslije posmedi, a uskoro javljaju se po dvije uzdužne pukotine u kori i to redovno po jedna sa svake strane nabrekline. Kasnije javljaju se i daljne uzdužne pukotine više u sredini nabrekline, a konačno počinje pucati kora i popreko tako da postane potpuno vidljivo crnkasto smeđe staničje oboljele kore. Daljnim raspadom te kore u sredini nabre-

kline počinje se srednji dio sve jače i jače udubljavati. Staničje kore sa ruba raka diobom nastoji prerasti nastalu ranu, ali biva opet razoreno i tako se sve više povećava površina raka. Nakon više godina u toj međusobnoj borbi između kore i bakterija nastaju sve veće rakaste tvorevine. U početku su nabrekline tek koji centimetar velike, no nakon pucanja kore postaju veće, a stari rakovi mogu da budu po 10 cm pa i do 20 cm veliki. Djelovi kore u sredini raka raspadnu se i nestaju potpuno, te proces raspada zahvata u kambij i drvo. Uništenjem kambija prestaje tvorba drva u sredini raka, no zato se pojačava tvorba drva na rubu, pa su i u ovom slučaju godovi na tim mjestima mnogo deblji nego na suprotnoj zdravoj strani grana, gdje su godovi veoma tanki. Godovi koji su nastali prije početka zaraze su i na strani raka potpuno razviti, šta više i nešto deblji nego oni na zdravoj strani, no oni nastali nakon što je zaraza prodrila u kambij ne razvijaju se u tom dijelu više, pa su na rubovima raka koso prisječeni, a na poprečnom presjeku izgledaju poput lepeze raspoređeni. Kora je na rubu raka u obliku preaslina, a boje je crnkasto smeđe. Isto tako je promjenjena i boja drva, no ta boja siže i po koji centimetar duboko u drvo, te je vanjski sloj drva tamno smeđ i drobi se, a unutarnji je čvrst i crvenkasto smeđ. Površina tog drva je gotovo crna i ispresijecana brojnim pukotinama u svim smjerovima. Sami godovi su u vanjskom sloju potpuno nevidljivi, a u unutarnjem posmedelom dijelu postaju nejasni. Prelazni tip raka pokazuje i u poprekom presjeku posredne oblike između oba istaknuta tipa raka.

Od naročita je interesa istaknuti još jedan način pojavljivanja raka, koji je moguće jasno uočiti samo u prvom početku razvoja, jer je kasniji izgled njegov jednak onom u otvorenog raka.

Često se naime opaža da između jačih rakastih tvorevina ili u većoj ili u manjoj blizini starih rakova nastaju nabrekline, koje su potpuno prekrivene zelenom korom. (Tabla IV). Na takvim mjestima sam pomno pretraživao koru ne bili našao ma kakvu makar i neznatnu povredu kore ili lenticelu. Ovom posljednjem slučaju poklonio sam naročitu pažnju već s razloga, što neki istraživači (Vliet) navode, da su često nalazili usred rakaste nabrekline, dok je još rak prekriven korom, crno obojenu lenticelu. Ta bi okolnost mogla pobuditi sumnju, da je prodor bakterije uslijedio putem lenticеле, premda su rezultati mojih infekcionih pokusa u potpunoj suprotnosti sa tom mogućnosti prodiranja. Pregledom većeg broja takvih nabrekline nije bilo moguće pronaći bilo kakvu ranicu, na mnogim od njih nisam našao niti lenticela. Oprezno odrezivanje kore sa nabrekline u tankim slojevima britvom uvjerilo me je, da je ista i pod peridermom

zdrava i normalne boje, a tek se u manjoj ili većoj dubini nalazilo posmedenje kore, vezano pri dnu sa smeđim nizovima staničja duž kore. Ta je smeđa linija vodila sve do velikog raka i prema svemu izgleda da je to put, kojim je nastala više spomenuta nabreklina, koja prema tomu nije nastala izvanjskom infekcijom već prodorom bakterija iz starog raka. Tako nastaje sekundarni rak. Da je to zaista tako biti će vidljivo iz anatomskih istraživanja, kojima je utvrđeno pridolaženje bakterije u tim spojnim linijama u kori, a i u provodnim elementima drva. Ta pojava nije osamljena, ako se uvaži činjenica, da je utvrđeno pridolaženje sekundarnog raka, kod sličnih bolesti masline i oleandra, uzrokovanim bakterijama, koje su u blizom srodstvu sa bakterijom sa jasena.

Pri kraju spominjem, da sam doduše nalazio na starim rakastim tvorevinama tragove regeneracijonog glodanja od *Hyl. fraxini*, no ti evidentno nisu stajali ni u kakvoj vezi sa postankom raka, a i hife neke gljive nalazile su se kadšto, no samo u starijim stadijima raka, ali peritecija *Nectria* vrsta nisam našao ni u kojem slučaju.

4. Izolacija bakterije i infektivni pokusi

Prvi pokušaji izolacije bakterijskog organizma, koji se nalazi u šupljinama kore, izvršeni su već u godini 1928, a kasnije više puta ponovljeni. Već kod prvih izolacija ustanovljeno je, da je taj organizam spora rasta, te da može uslijed toga biti često veoma brzo prerašten od mnogih saprofitičkih bakterija, koje se nalaze u obilju u mrtvom staničju starijih rakastih tvorevina. To je bilo razlogom, da su i moji prvi pokušaji ostali bez uspjeha, a to je bio po svoj prilici razlog i negativnog rezultata izolacionih pokušaja izvršenih po Stappu. Stoga sam u kasnijim izolacijama pošao drugim putem, te sam u starih rakova u tu svrhu odabrao samo malo zaraženog staničja na granici prema zdravoj kori. Taj dio zaražene kore pozna se lako po tom, što se između smeđeg i zdravog staničja nalazi zona, koja kao da je ponešto vodom prožeta. Izolacija bakterije iz tog dijela kore, koja je bila isjeckana sterilnim skalpelom u grlu epruvete sa sterilnom vodom i zatim suspendirana u toj vodi ostala je neko vrijeme stajati da mogu bakterije difundirati u vodu, dovela je često puta do potpuno jednakih kolonija samo organizma uzročnika bolesti. Kadšto bile su primiješane i kolonije nekih saprofita, no te u toliko malom broju, da je bio dovoljan broj kolonija uzročnika potpuno izolovanih i prema tomu podesnih za čistu kulturu. U kasnijem radu, kad sam upoznao narav potpuno zatvorenih nabreklina sekundarnog raka, vršio sam ponajčešće izolacije iz njih, a tu nije uspjeh nikad izostao, jer sam dobio uvijek samo kolonije pravog organizma.

Izolacija je ponajčešće vršena na agaru sa dodatkom krumpirova soka i dekstroze, te su se bakterijske kolonije javljale u roku od 2—3 dana, kako je to vidljivo iz slijedećeg pregleda:

Datum cijeplj.	Broj izolacija	Dan prvog pojava	Dan jasnog razvoja	Primjesa drugih organizama	Dio raka upotrebljen za izolaciju
15. V. 1928	15			Već 16. V. u 8h u jutro prekrive ploče saprofitnim bakterijama	Stari rakovi
20. V. 8h	10	23. V. 8h	24. V. 10h	Pojedinačne kolonije saprof. bakt.	Stari rakovi, ali više prema rubu
24. V. 8h	9+6	26. V. 8h	27. V. 10h		Izolacija sa ruba mladeg stadija raka
27. V. 10h	12	29. V. 10h			" " "
28. VII. 9h	12	30. V. 8h			" " "
30. X. 5h	12	2. XI. 9h jut.			Sekundarni rak
21. V. 1929	15	23. V. 10h jut.	24. V. 10h		" "
17. VI. 10h	6	19. VI. 10h		Ponajviše saprofiti i pojedinačno parasit	Staro rakasto stanište
4. VIII. 10h	9	6. VIII. 4h ppodne			Sekundarni rak
4. XI. 9h	12	7. XI. 12h			Mladi dosta zatvoren rak

Sa bakterijom dobivenom iz tih raznih izolacija vršeni su infektivni pokusi, ponajprije na jasenu, da utvrdim njezinu patogenost, a zatim su vršene infekcije na Američkom jasenu (*Fraxinus americana alba*), maslini i oleandru. Rezultati tih pokusa prikazani su u slijedećoj tabeli:

Tabela II

Datum infekcije	Vrsta biline	Broj inficiranih bilina	Broj kontroln. bilina	Rezultat infekc.	Kontrola	Reizolacija
30. V. 1928	Fraxinus excels.	10	4	++	—	+
7. VI. 1928	" "	17	6	+++	—	Cijepljeno samo u mlado drvo
15. VI. 1928	" "	14	4	++	—	+
19. V. 1929	" "	5	2	+++	—	+
29. V. 1929	" "	6	2	+++	—	+
	Fraxinus americ.	5	2	—	—	—
	Nerium oleander	4	2	—	—	—
	Olea europea	6	2	—	—	—
11. VI. 1929	Fraxinus excels.	8	3	++	—	+
	Fr. americ. alba	3	1	—	—	—
	Nerium oleander	3	1	—	—	—
	Olea europea	3	1	—	—	—
20. VI. 1929	Fraxinus excelsior	5	3	—	—	Infekcija vršena samo prskanjem bakterijskom suspenzijom
30. VI. 1929	" "	10	4	—	—	

Infekcijoni pokusi vršeni sa bakterijom izoliranom iz jasenovog raka pokazali su da su sve izolacije patogene na jasenu, a intenzitet zaraze zavisio je dosta jako o mladosti izbojaka na kojima je vršena infekcija. Infekcije u mlade izbojke izazvale su življu reakciju nego one vršene u koru starijih grana. U svakom slučaju uspješne infekcije zapaženo je već nakon 2—4 dana oko uboda igle, kojim je unesena bakterija u staničje, kao da je staničje ponešto prožeto vodom. Nakon 14 dana razvile su se već male rakaste tvorbe hipertrofijom staničja (Tabla V), a koji mjesec dana iza toga bio je već rak izrazit. (Tabla VI). U kasnijem razvoju nastaju tipični rakovi. Ipak moram istaknuti, da često nisam dobio veće rakaste tvorbe s razloga, što rast mladica u stakleniku nije bio tako bujan kao onih u prirodi. Osim toga je infekcija sa više uboda na istom izbojku dovodila do brzog sušenja takvih mladica, a često puta do slabog razvoja, jer odumiranjem zaraženog staničja biva cirkulacija vode jako umanjena i konačno potpuno onemogućena. U svakom slučaju, gdje je umjetnom infekcijom polučena zaraza, dobiven je ponovnom izolacijom isti organizam s kojim je infekcija izvršena. Pokušaji da dobijem infekciju samo prskanjem jasena sa bakterijskom suspenzijom, no bez ranjavanja biline, bili su potpuno bezuspješni.

Od interesa je da istaknem, da *Fraxinus americana alba* nije pokazala niti traga infekcije iako su pokusi vršeni sa istim izolacijama organizma koje su izazvale raka na običnom jasenu. Isto tako pokazalo se da ta bakterija ne može zaraziti oleander, a na maslini zapaženo je tek neznatno posmeđenje staničja oko uboda sa iglom, pa i neznatno nabreknuće staničja. Kasnije nije opaženo nikakvo napredovanje bolesti, a ponovna izolacija bila je negativna pa možemo smatrati da ta bakterija nije sposobna za parazitizam na maslini. Sve kontrolne biline običnog jasena, američkog jasena, masline ili oleandra ostale su potpuno nepromjenjene, te su kasnije ubodi iglom potpuno zarasli.

Ti su rezultati infekcija tim značajniji, što će se iz kasnije izloženih istraživanja o morfologiji i ponašanju u kulturi pokazati da je ta bakterija veoma srodna onoj sa masline i oleandra. Stoga je od interesa, da ovdje istaknemo rezultate istraživanja C. O. Smitha i N. Browna o infekciji raznih bilina pa i jasena po maslinovoj i oleandrovoj bakteriji. Pokušaji N. Brownove, da sa maslinovom bakterijom *Pseudomonas Savastanoi* (Smith) Stevens izazove infekciju na američkom i evropskom jasenu bili su negativni. C. O. Smithu je uspjelo da izazove patološke promjene sa tom bakterijom na maslini, *Fraxinus velutina*, *Floribunda* i nekim drugim bilinama, no nije uspio da izazove patološke promjene na oleandru. Isti istraživač vršio je uspješne infekcije sa organizmom izoliranim iz oleandra (*Pseudomonas*

savastanoi var. nerii) na oleandru, maslini kao i na *Adelia acuminata* i *Chionanthus virginica*, no nije mu uspjele inficirati osim drugih bilina *Fraxinus floribunda*, a niti *Fraxinus velutina*.

D'Oliveira opet navodi da nije nalazila nijedne biline, koju bi bila kadra zaraziti i maslinova i jasenova bakterija. Osim toga posljedice infekcije maslinove bakterije su tipične izrasline poznate pod imenom tubercula, a jasenov organizam izazivlje samo rakaste tvorevine. Te unakrsne infekcije sa spomenutim organizmima iako su ponešto protuslovne ipak pokazuju jasno, da su ti organizmi dosta različiti kraj sve njihove nalikosti u ponašanju u čistoj kulturi na raznim hranivim sredstvima.

5. Morfologija i ponašanje organizma u kulturi

Jasenove bakterije su štapići, koji su dosta kratki, te dolaze u hranivim sredstvima pojedinačno ili po dva zajedno, a kadšto i po više štapića u jednom lancu. Bakterija je gibiva, te imade 1—4 polarne cilije. Spora ne stvara, a bojadisana thioninom je veličine $1.5-2.8 \times 0.5-0.8 \mu$. Bojenje sa karbol fuksinom, metilen.-plavilom, kristalvioletom, dahlia bojom i thioninom je veoma dobro, a ne prima boju bojadisana po Gramovoj metodi, te je prema tomu Gram-negativna. Površinske kolonije na krumpirovom agaru su okrugle, uzdignute, glatke, sjajne, bijele boje, a u prolaznom svijetlu sivobijele, te imadu nakon 3—4 dana promjer 1—3 mm. Kolonije u dubini agara su bijele, ovalne ili vretenaste, te prozirne. Na kosini agara je prozirno bijela i filiformna rasta, a rubovi su ponešto valoviti. Kolonije na želatini sa buljonom slične su onima na agaru tek im je rub ponešto valovit, površina malo nabrana, a želatina ne biva otapana. Rast u ubodu u želatini je dosta polagan, ponajjači na vrhu uboda, a slab u dubini. Želatinu ne otapa, a ne mijenja niti boju hranivog supstrata. Rast na kosini agara sa dodatkom dekstroze, peptona i lakmusa je veoma bujan, a lakmus postaje izrazito crvene boje. Sličan je slučaj i kod kultivacije bakterije na agaru no sa pridodatkom galaktoze odnosno saharoze, jer i ovdje u jednom i drugom slučaju lakmus jasno crveni, no jače u hranivom sredstvu sa galaktozom nego u onom u kojem se nalazi saharoza. Rast u buljonu je obilan, te već za par dana postaje buljon naskroz mutan. U početku ne vidi se na površini buljona niti kožica niti rub, no nakon 10 dana javlja se raskidana kožica, a istovremeno nalazi se i sediment na dnu epruvete. Rast u buljonu pod utjecajem para kloroforma je spor i dosta slab. U 2% peptonu stvara se na površini slaba kožica, koja je izrazito žuta, a kasnije smeđe žuta. U 2% saharozij raste bakterija veoma slabo. U 2% otopini maltoze sa 1% peptonom stvara organizam na površini samo pahuljice, ali ne stvara kožicu. Na dnu epruvete stvara talog, a tekućina je smeđe boje. U 2% otopini saharoze sa 1% peptona raste organizam bujno, stvara na površini

kožicu, a na dnu sediment. Tekućina postaje izrazito smeđe boje. U fermentacijonim posudama sa 2% otopinom peptona i 1% slijedećih ugljo-hidrata: dekstroze, galaktoze, laktoze, saharoze, maltoze, manita i glicerina, raste organizam obilno u otvorenom dijelu posude, no ne stvara plina ni u jednom slučaju. U mlijeku sa dodatkom lakmusa raste organizam dobro, a boja lakmusa postaje izrazito plava dakle je mlijeko izrazito alkalično. U mlijeku se ne stvara gruševina, a redukcija lakmusa je polagana, te mlijeko konačno nakon 3 mjeseca postaje violetne boje. (»dark slate violet po Ridgway-u«). U mlijeku sa dodatkom metilenskog plavila nastupa polagana redukcija metilenskog plavila, a boja je ponajprije svijetlo smeđa, ružičasta i konačno smeđa, a na vrhu je mlijeko zelenkaste boje. U čistom mlijeku također ne dolazi do tvorbe gruševine, a boja postaje ponajprije nešto žuta u jednim epruvetama, a drugim malo smeđa, kasnije smeđija (warm buff po Ridgway-u) i konačno tamno smeđa (sudan brown po Ridgway-u). U Cohnovoj otopini dobar rast sa tvorbom slabe kože na površini otopine. U nekim epruvetama nalazi se obilje kristala amonijsko-magnezijskog fosfata na stijenama epruvete i na kožici, a u drugim ne nalazimo kristala. Konačno postaje tekućina lijepo zelene boje poput one, koja imaju graškova zrna nekih sorta, no osim toga pokazuje tekućina fluorescencu. U Ushynskijevoj otopini u početku ponešto slab rast u nekim epruvetama, no kasnije nakon tjedan dana obilan rast sa tvorbom kože na površini i prstena na rubu i obilnim viskoznom talogom na dnu.

U Fermijevoj otopini rast nije prebujan, a kasnije stvara se na površini slaba kožica. Rast na buljon agaru sa dodatkom škroba pokazuje nakon 14 dana dosta obilno rastvaranje škroba po 2 cm uokolo kolonije. (Proba sa zasićenom otopinom joda u 50% alkoholu). U buljonu sa dodatkom kalijevog nitrata ne nastupa redukcija nitrata. U Dunhamovoj otopini rast dobar, a tvorba indola dosta slaba, no reakcija nastupa istom nakon zagrijavanja u vodenoj kupci. (Dokaz indola po Salkovskom). Organizam raste između 5—34° C, a temperatura od 48° C ubija organizam ako biva izložena kultura u buljonu djelovanju te temperature u trajanju od 10 minuta. Što se tiče rasta u odnosu prema reakciji hranivih sredstava utvrđeno je, da u buljonu čija se reakcija u raznim epruvetama kretala između pH 4,5—9, raste organizam počam od pH 5,5—8,5. Način rasta organizma u fermentacijonim posudama pokazuje da je organizam izrazito aeroban.

6. Usporedba jasenove bakterije sa onima sa masline i oleandra

U tabeli broj III prikazane su morfološke karakteristike, ponašanje u kulturi, kao i biokemijske reakcije triju organizama koji napadaju jasen, maslinu i oleander.

Pregledom u tabeli iskazanih osebina vidimo, da sva tri organizma pokazuju međusobno sličnosti, no da pri tom postoje neke razlike obzirom na veličinu tih organizama i rast u Co-honovoj odnosno Ushynskyjevoj otopini. Iz ranijih infekcijskih pokusa vidljivo je da je svaki od njih patogen na bilini na kojoj i u prirodi dolazi, te da nije sposoban izvršiti zarazu na druge dvije biline. Kad bi uvažili samo male razlike, koje pokazuju ti organizmi u kulturi lako bi se odlučili, da smatramo organizam sa oleandra jednim varijetetom, a organizam sa jasena drugim varijetetom maslinove bakterije *Pseudomonas Savastanoi* (Smith) Stevens, kako su to već učinili za prvog Smith C. O., a za drugog N. Brown. Ako pak uočimo specifičnost tih organizama obzirom na napadane biline i tip reakcije, koju izazivaju, skloni smo vjerovati, da je živa bilina mnogo pouzdanije sredstvo diferencijacije nego li od nas upotrebljavana hraniva sredstva. Činjenica da nema biline, koju bi istovremeno napadala ma koja dvojica od tih organizama dovodi nas nužno do zaključka da su ti organizmi posebne vrste. To je vjerojatno i bilo razlogom da je oleandrovoj bakteriji Ferraris nadjenulo ime *Bacterium Tonellianum* Ferr., a kasnije ju je C. O. Smith smatrao samo varijetetom maslinove bakterije te ju nazvao *Ps. Savastanoi* var. *nerii* Smith, jer mu nije bilo poznato ranije ime dano bakteriji po Ferraris-u.

Gledom na jasenovu bakteriju treba istaknuti da je N. Brownov-a držala i ovu samo varijetetom maslinove bakterije, te ju nazvala *Bacterium Savastanoi* var. *fraxini*, no kako je po mojem mišljenju i za ovaj slučaj odlučniji momenat, da se ona javlja isključivo na jasenu, treba ju smatrati i posebnom vrstom.

Prema tome bi novo ime i sinonima za tu bakteriju bila sljedeća:

- Pseudomonas fraxini* (Brown) Škorić
- Bacterium Savastanoi* Smith var. *fraxini* Brown
- Bacterium fraxini* (Brown) Škorić
- Phytomonas fraxini* (Brown) Škorić.

7. Patološka histologija

Da bi dobio pravilnu sliku o postanku raka, a naročito o histološkim promjenama, koje nastaju nakon zaraze, odabirao sam za tu svrhu u prvom redu što mlade stadije zaraze kako se nalazi u prirodi, a služio sam se dakako i materijalom, dobivenim umjetnom infekcijom. Materijal je bio fiksiran u mješavini formalina, octene kiseline i alkohola, uklopljen u parafin, rezan mikrotomom i bojadisan. To je bilo tim potrebnije što su dosadnji istraživači ponajčešće istraživali stariji materijal, pa uslijed toga došli do jednostranih zaključaka. Kako su istraživanja sta-

Tabela III

Upoređenje jasenove, maslinove i oleandrove bakterije i njihovo ponašanje u čistoj kulturi.

Naznaka	Jasenov organizam	Maslinov organizam (Smith - Brown)	Oleandrov organizam C. O. Smith
Morfologija	Štapičasta bakterija dolazi ili pojedince ili po dvije zajedno kadšto i u lancima. Organizam je gibiv pomoću 1-4 polarne cilije. Bojadisan thioninom imade veličinu $1,5-2,8 \times 0,5-0,8 \mu$. Spora nema.	Kratki štapići pojedince, po dva zajedno ili u lancima sa 1-4 polarne cilije. Bakterije bojadisane karbol - fuksinom imadu veličinu $1,2-1,5 \times 0,4-0,5 \mu$. Spore ne stvaraju.	Štapići na kraju zaobljeni, $1,5-2,5 \times 0,5-0,6 \mu$ veliki sa 1-3 polarne cilije. Nema kapsula, a niti spora.
Bojadisanje	Bojadiše se veoma dobro sa karbolnim fuksinom, metil - plavilom, kristalnim violetom i thioninom, a ne bojadiše se po Gramovoj metodi, dakle je Gram negativan.	Karbol fuksin, metilni violet i dahlia bojadišu lijepo bakteriju, a bojadisanje po Gramu ne uspijeva. Otpornost protiv oduzimanja boje kiselinom ne pokazuje.	
Produkcija pigmenta	Na buljon agaru su kolonije bijele. Na krumpirovom agaru su kolonije bijele. Na buljon želatini prozračno bijele.	Na agaru sa buljonom kolonije su bijele, na želatini prozračno bijele, a na krumpiru tamno maslinasto smeđe.	Kolonije bijele.
Odnos prema kisiku	Organizam je aeroban, što se vidi jasno po rastu u fermentacionim posudama, jer raste samo u dijelu gdje je pristup kisika moguć.	Organizam je aeroban, što se vidi na kulturama u fermentacionim posudama, a i buljon agaru sa dekstrozom.	Organizam je aeroban.
Odnos prema konc. vodikovih iona	U buljonu razne koncentracije vodikovih iona raste od pH 5,5-8,5.	U buljonu raste uz konc. vodikovih iona pH 6,5-9,5, a optimalan rast je kod pH 7,0-7,2.	Raste u buljonu uz koncentraciju vodikovih iona od pH 5,3-8,9.

Utjecaj temperature	Organizam raste od 5-34° C a izložen utjecaju temperature od 48° C na 10 minuta ugiba.	Optimalna temperatura 25-26° C maksimalna 34-35° C i minimalna 12° C. Ubitačna temperatura se kreće između 43-46° C	Ubitačna temperatura 51° C.
Rast na krumpir. agaru	Površinske kolonije bijele, okrugle, uzdignute, glatke i sjajne. U prolaznom svijetlu sivo bijele, a nakon 3-4 dana 1-2 mm velike. Kolonije u dubini agara su ovalne ili vretenaste i prozirne.	Površinske kolonije glatke, sploštene, sjajne, bijele, okrugle, a rub im je jednolik ili nešto valovit. Kolonije su providne u prolaznom svijetlu, a nakon 3-4 dana su velike 3-4 mm.	Kolonije za osam dana 1-3 mm, sploštene, okrugle, sjajne sa valovitim rubom. U prolaznom svijetlu sivkaste boje, ponešto mrežasto naborane prema rubu.
Rast na kosini agara	Rast filiforman, a rubovi su ponešto valoviti. Boje je prozirno bijele.	Rubovi ponešto valoviti, rast manje obilan, boje prozirno bijele, a površine glatke.	Rast obilan, sjajan, bijelo-siv sa nepravilno valovitim rubom.
Rast na želatini sa buljonom	Kolonije pokazuju, rast sličan onom na agaru, no rub kolonija je ponešto valovit i površina naborana. Bakterija ne otapa želatinu.	Ne otapa želatinu, a kolonije su okrugle, providne sa valovitim rubom i borama u sredini. Promjer kolonija za 4 dana 1,5-2,5 mm.	Kolonije 1-2 mm, nakon 8 dana, a želatinu ne otapa.
Rast u ubodu u želatini sa buljonom	Rast u ubodu je dosta polagan, jači na vrhu uboda, a slabiji u dubini uboda. Želatina ne biva otapana, a ne mijenja se niti boja hranivog sredstva utjecajem organizma.	Slab rast na površini uboda, a prevlaka tanka i bijela. U dubini rast jedva primjetljiv, a želatina ne biva otapana.	Bakterija ne otapa želatinu a ne mijenja niti boju želatine.
Rast na kosini agara sa dodatkom dekstroze, peptona i lakmusa.	Rast je bujan, prozirno bijel, sluzav, a lakmus postaje izrazito crven, znak tvorbe kiseline.	Rast dobar, lakmus crveni.	Rast prilično obilan, kasnije slabiji. Lakmus crveni brzo i ostaje trajno crven.
Rast na agaru sa dodatkom galaktoze, peptona i lakmusa.	Ovdje je promjena slična kao u prijašnjem slučaju, jer i tu lakmus intenzivno pocrveni.	Umjereni rast organizma, a lakmus crveni.	I u ovom slučaju lakmus crveni i ostaje crven.

Naznaka	Jasenov organizam	Maslinov organizam (Smith - Brown)	Oleandrov organizam C. O. Smith
Rast na agaru sa dodatkom saharoze, peptona i lakmusa. Rast u buljonu	Slično kao u prednjem slučaju, no tek je crvena boja lakmusa manje intenzivna. Rast obilan, za nekoliko dana je buljon potpuno mutan, a nakon 10 dana javlja se na površini tekućine parcijalna kožica, a na dnu epruvete sediment.	Rast primjereno dobar, lakmus postaje purpurno-crven. Rast nije tako obilan kao u jasenova organizma. Na površini slaba kožica.	Hranivo sredstvo postaje nešto purpurno u blizini bakterijske kolonije. Rast obilan sa raskidanom kožicom i malo taloga na dnu.
Rast u buljonu pod utjecajem para kloroforma. Rast u 2% peptonu	Rast u ovom hranivom sredstvu je spor i slab. Na površini stvara se slaba kožica, a boja hranivog sredstva je ponajprije izrazito žuta, a kasnije smeđe žuta.	Rast priličan, ali usporen. Bujan rast sa kožicom na vrhu, sredstvo kasnije nešto potamni.	Rast dobar. Ne stvara se niti kožica niti talog, no hranivo sredstvo postaje poput meda žuto.
Rast u 2% saharozi.	Organizam raste, no veoma slabo.	Obilan rast sa jakim talogom na dnu, a tekućina postaje svijetlo - smeđa. Na površini tekućine pseudozoogloee	Slab rast bez kožice i taloga.
Rast u 2% maltozi i 1% peptonu	U toj tekućini javljaju se samo slabe pahuljice, na dnu epruvete nastaje talog, a otopina postaje smeđe boje.	Bujan rast i jaki talog, otopina postaje svijetlo smeđa, a na površini pseudozoogloee.	Stvara se raskidana kožica i prsten na rubu tekućine, a tekućina je ponešto smeđe boje.
Rast u 2% saharozi i 1% peptonu.	Organizam raste bujno, te stvara na površini tekućine kožicu, a na dnu sediment: Tekućina pod utjecajem bakterije postaje izrazito smeđe boje.	Bujan rast i jaki talog, otopina postaje svijetlo smeđa, a na površini pseudozoogloee.	Ne stvara plin, a razvoj organizma obilan.

Rast u fermentac. posudama u 2% otopini peptona i 1% dekstroze.
Isto, no samo sa 1% galaktoze.

Isto, no sa 1% laktoze.
Isto, ali sa 1% saharoze.
Isto, ali sa 1% maltoze.
Isto, ali sa 1% manita.
Isto, sa 1% glicerina.
Mlijeko sa dodatkom lakmusa.

Mlijeko sa dodatkom metilen-plavila

Čisto mlijeko

Organizam se razvija obilno u otvorenom dijelu posude, gdje imade obilan pristup kisika, no ne stvara plin. Organizam raste bujno u dijelu fermentacijone posude gdje je dovoljan pristup kisika, no ne stvara plin.

Isto.
Isto.
Isto.
Isto.
Isto.

Organizam raste dobro, a lakmus postaje intenzivno plav, mlijeko postaje alkalično. Gruševina se ne stvara. Redukcija lakmusa je polagana, a nakon 3 mjeseca postaje mlijeko violetne boje (dark slate violet po Ridgwayu).

Metilensko plavilo biva polagano reducirano, boja je ponajprije svijetlo-smeđa, zatim ružičasta i na poslijetku smeđa, tek je na vrhu mlijeko zelenkaste boje.

Bakterija ni tu ne stvara gruševinu. Ponajprije mlijeko žuti, poslije smeđi (warm buff po Ridgway-u) i konačno postaje tamno smeđe (sudan brown po Ridgway-u).

Rast obilan, a na površini pseudozoogloee: Na dnu jaki talog, a otopina slabo potamni. Plin ne stvara. Bujan rast, obilan talog i prsten sa pseudozoogloeamama na površini. Plin ne stvara.

Isto.
Isto.
Isto.
Isto.
Isto.

Mlijeko postaje plavo za 4 dana, a kasnije tamno-plavo. Mlijeko se ne gruša. Promjena boje veoma spora.

Mlijeko postaje istom nakon 20 dana ponešto smeđe, a ne gruša se i ne stvara se kiselina.

Isto.

Ne stvara plin, a razvoj organizma obilan.

Isto.
Isto.
Isto.
Isto.
Isto.

Mlijeko plavi i postaje jako alkalično. Nema gruševine, a redukcija lakmusa polagana. Tekućina postaje kasnije purpurna (slate purple).

Metilensko plavilo blijedi, a konačno postaje zelene boje.

U mlijeku ne nastaje gruševina, a postepeno mijenja boju u smeđastu i konačno postaje tamno smeđe.

Naznaka	Jasenov organizam	Maslinov organizam (Smith - Brown)	Oleandrov organizam C. O. Smith
Rast u Cohnovoj otopini.	Rast dobar sa tvorbom kožice na površini. U nekim epruvetama obilje kristala amonijsko - magnezijskog fosfata. Koначно postaje tekućina lijepo plavo zelene boje (pea green), a također fluorescira.	Fin bijel rast sa kristalima amonijsko - magnezijskog fosfata, no hranivo sredstvo ne mijenja boju i ne pokazuje fluorescencu.	Ova otopina biva obilno zamućena, te se u njoj kadšto javljaju kristali, a kadšto ne.
Rast u Uschynskijevoj otopini.	U početku rast slab, kasnije obilan, te se stvara na površini tekućine kožica, uokolo prsten, a na dnu epruvete obilan viskozni talog.	Bijeli rast, sredstvo skroz pomućeno. Na površini slaba kožica, a na dnu viskozni talog.	U ovoj otopini organizam ne raste.
Rast u Fermijevoj otopini.	Rast nije prebujan, a kasnije se javlja na površini slaba kožica.	Rast bijel sa kožicom, koja se kasnije kida u pahuljice i vlakna.	_____
Rast na agaru sa škrobom.	Bakterija vrši obilnu hidrolizu škroba do dva centimetra uokolo kolonije.	Bakterija vrši hidrolizu škroba no ne tako obilno i brzo kao jasenov organizam.	_____
Rast u buljonu sa dodatkom kalij. nitrata.	U toj otopini bakterija ne vrši redukciju nitrata.	Ne vrši redukciju nitrata.	_____
Rast u Dunhamovoj otopini i proizvodnja indola.	Rast dobar, tvorba indola slaba, a reakcija nastupa istom nakon zagrijavanja u vodenoj kupci (dokaz indola po Salkovskom).	Tvorba indola slaba, a nastupa istom u kulturama starim 21 dan.	Tvorba indola slaba i to tek nakon zagrijavanja na vodenoj kupki.

rijih razvojnih stadija raka dosta detaljno opisana, to sam se u tom pogledu ograničio samo na kontrolna ispitivanja, da provjerim dosadanje rezultate, te priklonio najveću pažnju samo izučavanju ranijih stadija. U posve ranim stadijima vidi se da se bakterija nalazi u intercelularnim prostorima kore i to ili u primarnoj kori ili u floemskom dijelu kore ili pak i u jednom i u drugom dijelu kore.

Bakterije se razmnažaju u intercelularnim prostorima i pri tom stvaraju obilje sluzi, što je lako moći utvrditi, kad metnemo svježe prereze u vodu, jer tada vidimo, kako ta sluz nabubra i upravo zamuti sliku. To se vidi i u obojenim preparatima, jer bakterije u većim šupljinama ne leže jedna do druge već se nalaze u skupinama kao oko nekih mjehurića koji leže u sluzi. Bakterije, a pogotovo sluz, u kojoj one leže, vrši veoma jaki tlak na susjedne stanice, razdvaja ih međusobno i tako postepeno proširuje intercelularne prostore. (Fig. 2). U daljnjem tečaju vidi se da taj tlak može biti tolik da dovodi do raskidanja stanica, pa to još više povećava šupljine u kojima se nalaze bakterije. Da je taj tlak prilično jak vidi se po tom, što su stanice u susjedstvu većih šupljina (lakuna) sa strane manjeg otpora upravo napadno sploštene i stiješnjene. Paralelno sa opisanim nastajanjem i povećavanjem šupljina ispunjenih bakterijama, stanice, koje okružuju te šupljine ponajprije postaju upravo napadno veće, a skoro se zatim počinju naglo i diobama pomnažati. Kad su spomenutim putem već nastale velike šupljine u zaraženoj kori, još su uvijek stanice, koje se nalaze u neposrednoj blizini šupljina, a dakako i one u većoj udaljenosti žive. (Fig. 3). Kad stanice u okolini šupljina počinju ugibati, istom tada počinje se stvarati ozledno pluto, koje odvaja pojedine dijelove kore i povećava napetost u staničju kore. Slojevi pluta doprinose još jačem uvećavanju šupljina nastalih u prvi čas isključivom djelatnošću bakterija. Ako je zaražena starija grana ograničena je u prvi čas zaraza samo na koru, a tek nakon duljeg ili kraćeg vremena odumiranjem kore postaje drvo ogoljeno, te tamni i puca. No u onom slučaju kad zaraza započne na mladim tek jednogodišnjim izbojcima zaraza se ne ograničava samo na koru već se proširuje i na drvo. U takvom slučaju imao sam mnogo puta prilike da utvrdim, da na isti način kao što je to slučaj u kori dolazi i do razdvajanja elemenata drva dakako naročito brzo u onim dijelovima gdje stanice još nisu odrvenile. Taj proces zadire i dublje u već odrvenjele elemente, pa tako može nastati potpuni proboj drva, a na taj način biva omogućeno prodiranje bakterija i u samu srčiku. Da li je to razdvajanje samo mehaničko uslijed spomenutog tlaka sluzi ili pri tom djeluju i enzimi izlučeni od bakterije nisam mogao zasad utvrditi.

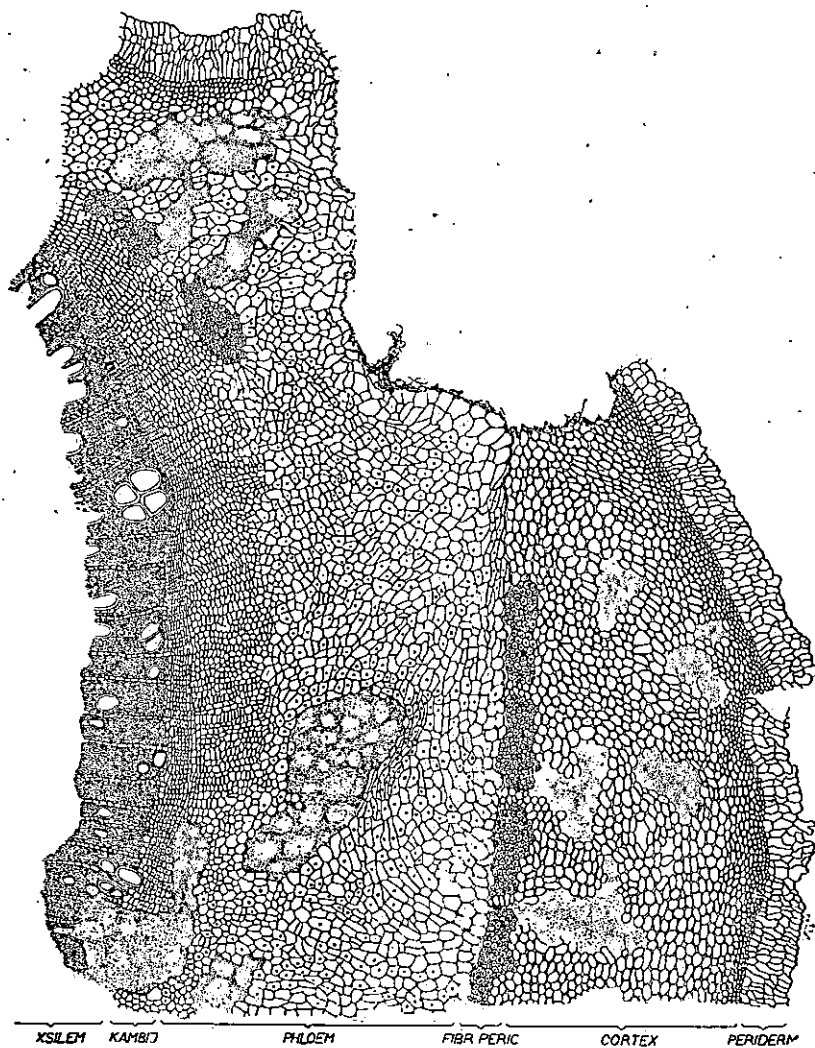


Fig. 1. Poprečni presjek kroz mladog raka sa bakterijskim lakunama u floemu i mladom drvu. — Cross-section through a young canker with bacterial cavities in the phloem and in the wood.

Magnific. oc. 4 × obj. 3.

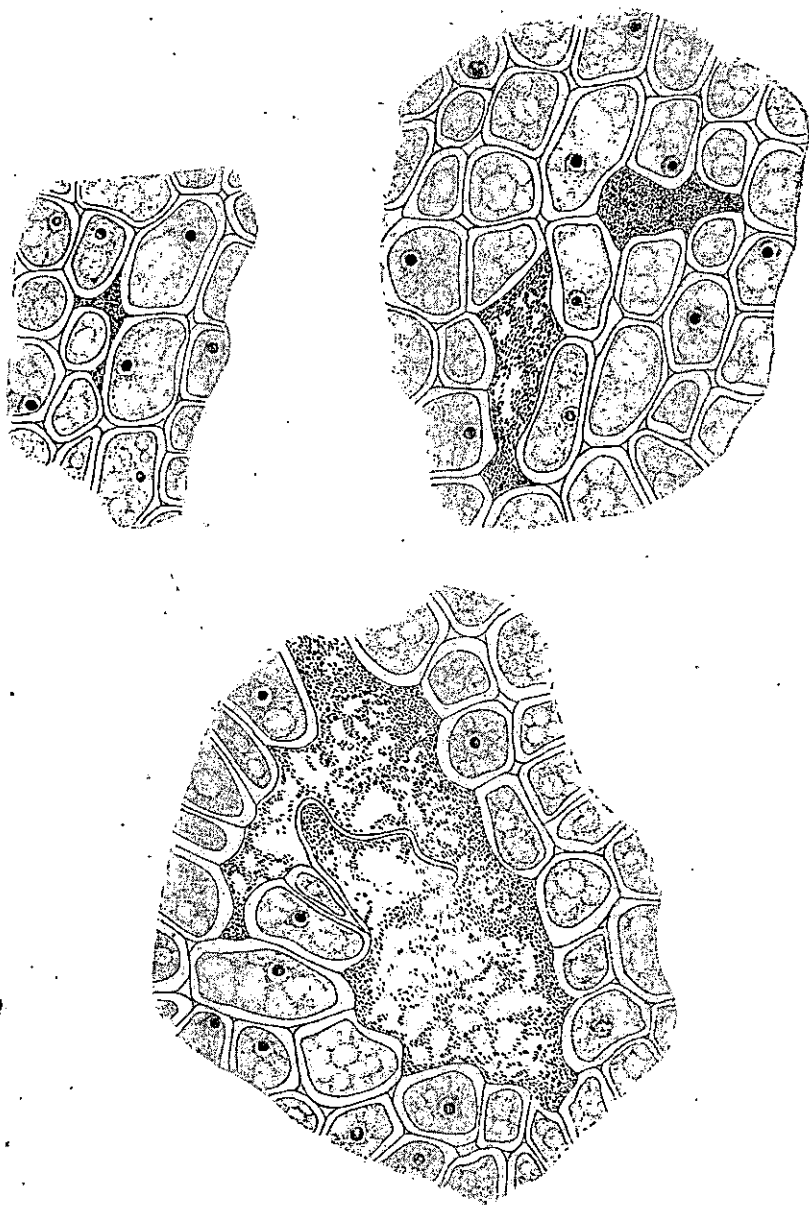


Fig. 2. Razvoj lakuna razdvajanjem stanica uslijed tlaka bakterijske sluzi. — Development of bacterial cavities by the pressure of bacterial slime.

Magnif. oc. $10 \times$ obj. $\frac{1}{12}$.

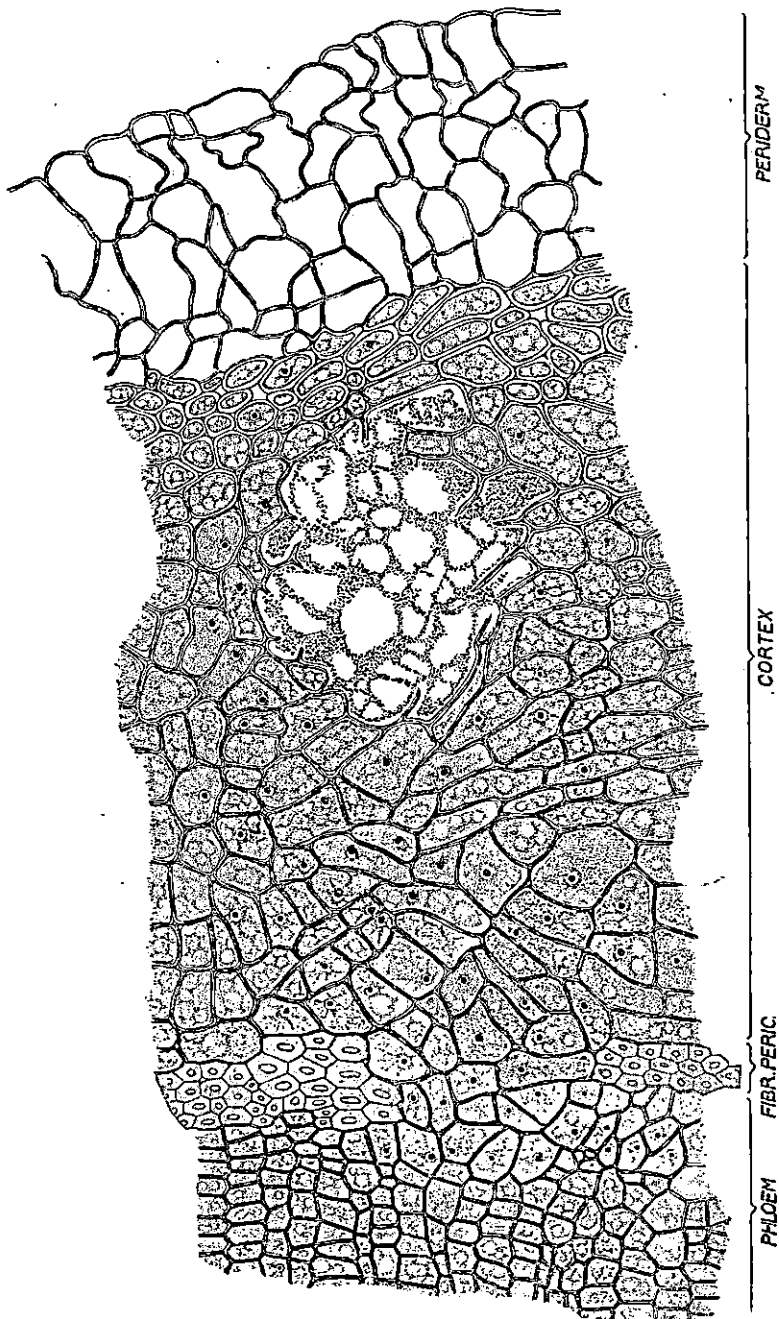


Fig. 3. Bakterijska lakuna u kori. — A bacterial cavity in the cortex.
Magnif. oc. 4 × obj. $\frac{1}{12}$.

U takvim slučajevima, gdje je razorno djelovanje bakterije zahvatilo drvo, pa prodrlo čak i u srčiku, (Fig. 5), nastaje mogućnost, da raskidanjem provodnih elemenata drva dospije bakterija i u provodne elemente (Fig. 4), te se njima kreće na veće ili manje udaljenosti u drvu. Inače nisam nalazio bakterije u nutrini niti drugih vrsta nepovređenih stanica, već se one nalaze samo intercelularno. Njihov nalaz po Vlietu u stanicama vjerojatno potiče odatle, što je radio sa rezovima rukom, te tako lako britvom unesao bakterije u stanice. Kad je kora jako obolila, tada se doduše bakterija nalazi u ponajvećoj mjeri u staničju u okolini šupljina, no može katkad da u tanjim trakovima prodre korom dalje duž grane i na drugom mjestu izazove ponajprije obilnu diobu stanica, a kasnije njihovo odumiranje. U tom slučaju opažamo poput graška zadebljala mjesta, ali kora nad njima je potpuno zelena i nepovredena. Tek skidanjem tanjeg ili debljeg sloja kore možemo se uvjeriti, da je staničje kore u dubini zaraženo, te nam postaje jasno da je na tom mjestu započela tvorba sekundarnog raka. Postoji li mogućnost da bakterija prodiranjem putem traheja, a koja činjenica je nesumnjivo utvrđena, na drugom mjestu izazove stvaranje sekundarnog raka kao što je opisani slučaj u kori, nije bilo moguće utvrditi. Spomenuo sam da se stanice, koje se nalaze oko šupljina (lakuna) sa bakterijama povećavaju i dijele. To povećavanje stanica i njihovo pomnažanje diobom toliko je jako i obilno, da kora na zaraženom mjestu znatno odeblja i nabubra, a kako periderm na površini grane, pa i likovnice u periciklu ne mogu da slijede rast spomenutog staničja, nastupa napetost, koja dovodi ponajprije do uzdužnog pucanja (Fig. 1), a kasnije i poprekog pucanja površinskih dijelova kore, kako je to već opisano kod opisa početnih stadija te bolesti. Taj proces pucanja kore biva još jači i obilniji, ako je međutim djelovanjem bakterije uginulo staničje u primarnoj kori, a bakterija prouzrokovala jako pomnažanje stanica u floemu. Tek sada počinju stanice postepeno odumirati a paralelno s time javlja se ozledno pluto, te kasniji raspad staničja kako ga je opisao Van Vliet (19.). Nesumnjivo je da u starijoj zaraženoj kori i drvu uslijed zaraze nastupaju promjene u izgledu raznih vrsta stanica, pa tako likovnice bivaju kraće, sitastih cijevi imade manje, a mnogo je veći broj rudimentarnih sitastih cijevi nego u normalnom floemu. Ista sudbina je i stanica pratilica sitastih cijevi. Sitaste cijevi budu naročito u samom raku stlačene, one požute, te se nalaze u cijelim nizovima, a lako ih je uočiti radi njihove boje. U kori se javljaju i cijele grupe sklereida, a naročito su napadni slojevi feloderma. Sam kambijski sloj u blizini zaraženih mjesta, a pogotovo kad se nalazi do samih šupljina, imade više nizova stanica, koje su osim toga i

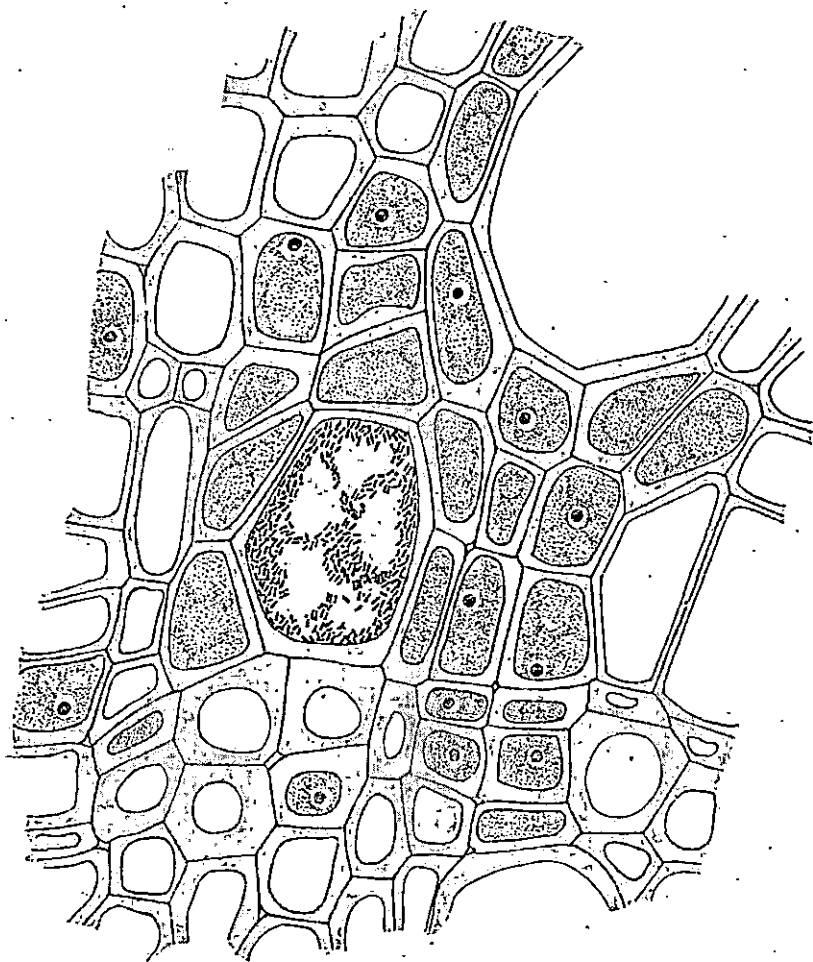


Fig. 4. Poprečni presjek kroz drvo sa bakterijama u traheji. — Cross-section trough the wood with bacteria in a tracheal element.

Magnif. oc. 10 × obj. $\frac{1}{12}$.

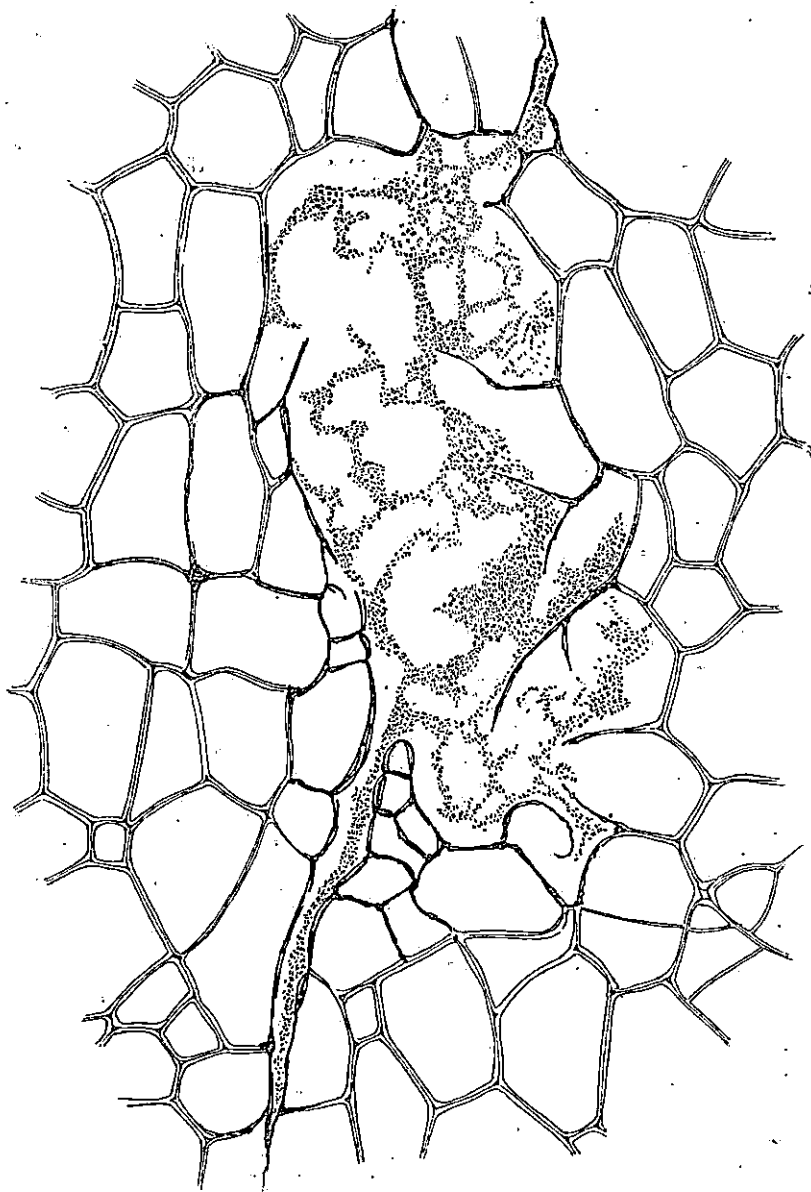


Fig. 5. Bakterijska invazija u staničje srčike. — The tissues of the pith invaded by bacteria.

Magnif. oc. 4 × obj. $\frac{1}{12}$.

šire. Drvo također pokazuje vidne promjene, jer se u ranom drvu nalazi manji broj traheja, a drvena vlakna su više radijalno poredana, kraća i tanjih membrana odnosno većeg lumena. Parenhim je obično promjenio boju, postao smeđ, a sadržaje često kao i zrake srčike zrnca škroba. Zrake srčike mijenjaju se u zaraženom drvu, jer postaju po više stanica debele, kadšto i 5 stanica široke, a u nutrini stanica nalazi se često po jedan veći kristal i tek kadšto još po nekoliko manjih u istoj stanici.

Pri kraju je od interesa da istaknem, da sam u ranije opisanim mladim stadijima raka nalazio samo bakterije, a samo u starijima, gdje je već nastupio raspad staničja odnosno obilno raspucala kora, nalazio sad češće sad rijede i hijaline hife neke gljive, koju nisam pokušao identifikovati.

Ova histološka istraživanja omogućila su, da se odredi i starost pojedinih rakastih tvorevina. Rakovi, gdje je infekcija započela na mladim jednogodišnjim ili dvogodišnjim granama su i onda ponešto veći, kad su stari tek jednu ili dvije godine i to s razloga što mlada kora i brzi rast mladica omogućuje obilniju i nagliju hipertrofiju i diobu stanica. Stoga su takve rakaste tvorevine često po nekoliko centimetara duge, a i po koji centimetar široke. Kad je infekcija započela na starijim granama, tada su rakaste tvorevine u prvi čas manje, a sam dalji rast raka ponešto je sporiji. Jednu godinu stari rakovi obično su dosta maleni tek po koji centimetar veliki. Velike rakaste tvorevine, kako ih često nalazimo bilo na deblu bilo na debelim granama u krošnji, a čija duljina i širina iznosi i po deset i po više centimetara, stari su po 10, 15, 20 pa i 30 godina.

8. Širenje i raznošenje bolesti

Ranije je utvrđeno da ova bakterija prodire samo putem rana, a po mišljenju nekih istraživača (Vuillemin) omogućuje joj ulaz u koru gljiva *Chaetophoma oleacina*. Neki su mišljenja, da u ovom slučaju vrši možda ulogu prenosioca tog organizma grinja *Phytoptus fraxini*, te im je taj prenos vjerojatan već stoga, što je Petri (9) učinio vjerojatnim, da maslinova mušica *Dacus oleae* prenosi *Pseudomonas Savastanoi* Smith u probavnom traktu.

Noack nasuprot drži da na površini raka za kišnog vremena nakupljena sluz, kad se posuši, biva vjetrom raznešena. Opažanja vršena za kišna vremena u prirodi pokazala su da doista sluz primitkom vode nabubri, te izlazi na površinu, a odatle biva sapirana na koru grane ili debla na kojem se rak nalazi, no da također sa kapljama kiše pada i na druge grane. Dakako da na posljednji način ima prilike da dospije i na deblu i grane mladih drveta, koja se nalaze podno starijeg zaraženog drva.

Da takav način raznošenja bakterije doista postoji u naravi imamo osim direktnih opažanja dokaz i u tom, da je sav jasenov pomladak, koji se nalazi podno krošnje zaraženog stabla također zaražen, a već u udaljenosti od nekoliko metara izvan dohvata krošnje ne nalazimo niti traga zarazi. Kad bi vjeter ili insekti vršili prenos bakterija, teško je shvatiti, da već na maloj udaljenosti od kojih desetak metara nema traga zarazi. Taj se način prenosa bakterije očituje i u tom što zaražena stabla nalazimo obično u grupama, a tu pojavu možemo lako dovesti u sklad s ranije istaknutim opažanjem, da su to stabla, koja su u mladosti stajala podno zaraženog starog stabla, pa su bila tada zaražena. Ponešto je drukčiji slučaj onda, kad se bolest javi u mladnoj dobro sklopljenoj čistoj sastojini jasena, gdje grane jednih stabala zalaze u krošnju drugih, tada je dakako moguće širenje bakterije kišom sa stabla na stablo polagano po cijeloj sastojini. Da na kori grana i debla jasenovih stabala imade uvijek malih ranica bilo utjecajem smrzavice, tuče, oštećivanja po insektima ili pukotina koje nastaju odebljavanjem grana i debla, van svake je sumnje, a da su i veoma male rane dovoljne za infekciju sa tom bakterijom, možemo se lako uvjeriti umjetnom infekcijom. Činjenica, da se često na kori raka nalaze lenticеле, dovela me je na pomisao, da možda one služe za prolaz bakterija u nutrinu, no prskanje jasenovih grančica i lišća suspenzijom te bakterije nije u mojim pokusima dovelo nikad bilo do zaraze grana putem lenticela, bilo do zaraze lišća putem puči.

Prema tome izgleda prema dosada utvrđenim činjenicama, da je kiša glavni nosioc zaraze, a rane glavni put prodora bakterije u jasen, slučaj sličan onom u raznosu i infekciji maslinove bakterije na maslinama. Imade li i drugih mogućnosti raznošenja i prodiranja te bakterije treba da pokažu buduća istraživanja.

9. Obrana

Prema svemu našem dosadanjem poznavanju te bolesti evidentno je da su jedino rane mjesta, koja omogućuju parazitizam te bakterije. Stoga bi bila najbolja zaštita, kad bi bilo moguće spriječiti postanak rana, no to nije moguće, pa je potrebno da zaštitimo pristupimo s druge strane. Kraj sveg postojanja rana, ako nema drveta nosioca bolesti, tada ne postoji mogućnost infekcije. Stoga mora naša borba ići za tim da u mladim sastojinama prigodom čišćenja i proređivanja izvadimo sva zaražena stabalca, jer ona mimo toga što su pogibeljna kao nosioci zaraze, nepoželjna su i zato, jer će uslijed bolesti biti slaba oblika i grade. U starim sastojinama moramo bezuvjetno izvaditi sva rakava stabla već stoga da ne zaraze susjedna, čije su krošnje u

neposrednoj vezi sa krošnjom zaraženog stabla, a naročito stoga, da spriječimo infekciju podstojnog podmlatka i na taj način onemogućimo održanje bolesti na tom mjestu. Budući i u odsječenim zaraženim granama i deblima jasena živi bakterija još neko vrijeme, a pogotovo jer su ti rakovi kadšto zaraženi i *Nectria*-vrstama, koje mogu obilno ploditi na ležećem materijalu, biti će potrebno, da sav deblji materijal što prije izvezemo iz šume, a tanke neuporabive dijelove odmah spalimo.

10. LITERATURA

- 1) Brown N. A.: Canker of ash trees produced by a variety of the olive-tubercle organism, *Bacterium Savastanoi*. Journal of Agricult. Research Vol. 44. 1932. p. 701.
- 2) D' Oliveira M.: Notes on *Bacterium Savastanoi*. Transact. British Mycological Society Vol. XIX. 1935. p. 346.
- 3) Geyr H.: Eschenrindenrosen. Allgem. Forst. u. Jagdzeitung C. p. 64.
- 4) Henschel G. A. O.: Die Rindenrosen der Esche und *Hylesinus Fraxini*. Centralblatt. f. d. gesam. Forstwesen 1880. p. 514.
- 5) Judeich J. F. und Nitsche H.: Lehrbuch der mitteleuropäischen Forstinsekten Bd. I. 1895. p. 477, 480.
- 6) Noack F.: Der Eschenkrebs, eine Bakterienkrankheit. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten 1893. p. 193.
- 7) Nördlinger: Nachtrag z. Ratzeburgs Forstinsekten. Entom. Zeitschrift 1848. p. 225.
- 8) Nördlinger: Nachträge zu Ratzeburgs Forstinsekten 1856.
- 9) Petri: Ricerche sopra i batteri intestinali della Mosca olearia. Memorie d. R. Stazione di Patologia vegetale. 1909.
- 10) Ratzeburg J. T. C.: Die Forstinsekten I. Teil 1839. pag. 183.
- 11) Ratzeburg J. T. C.: Die Waldverderbniss II. Bd. 1868. pag. 274.
- 12) Richter H.: Die wichtigsten holzbewohnenden *Nectrien* aus der Gruppe der Krebserreger. Zeitschrift für Parasitenkunde Band I. 1928. pag. 24.
- 13) Smith C. O.: Pathogenicity of the olive-knot organism on hosts related to the olive. Phytopathology. Vol. XII. 1922. p. 271.
- 14) Smith C. O.: Oleander bacteriosis in California. Phytopathology Vol. XVIII. 1928. p. 503.
- 15) Smith E. F.: Recent studies of the olive tubercle organism. U. S. Depart. of Agric. Bull. 131. part IV. 1908.
- 16) Smith E. F.: Bacterial diseases of plants 1920. p. 391—404.
- 17) Sorauer P.: Handb. der Pflanzenkrankheiten Bd. II. 1 Teil. 1928. p. 218.
- 18) Tubeuf C.: Tuberkulose, Krebs und Rindengrind der Eschen (*Fraxinus*) Arten. Zeitsch. für Pflanzenkrankheiten. 46. Jahrf. 1936. p. 449.
- 19) Van Vliet J. Ij.: Esschenkankers en hun bouw. 1931. (Resume na njemačkom jeziku).

- 20) Vuillemin P.: Deuxième notice sur les travaux scientifique 1895.
 21) Vuillemin P.: Quelques champignons arboricoles nouveaux ou peu connus. Bull. Societe Mycol. de France XII. 1896. p. 41.
 22) Vuillemin P.: Traite sur la pathologie vegetale de prof. Bouchard. 1896.
 23) Vuillemin P.: Cancer et tumeurs vegetales. Nancy Soc. Sci. Bull. Séances (3) 1900. p. 37.

SUMMARY

The bacterial canker of the ash (*Fraxinus excelsior*) is a common disease in this country. Although it is found to some extent all over the country, it is most common in pure and mixed ash-stands along the river Sava and its tributaries. As a rule the infected trees are found in groups, but there are some cases where the ash-stands are almost uniformly infected. Quite common is the case, that the cankers are found all over the tree, but it is not seldom to find the trees, which bear cankers in the crown and sometimes on the stem only. When very young plants are heavily infected a dwarfing of the whole plant results. The trees of this kind although 10, 15 and 20 years old remain 1 or 2 meters high and have bush like appearance.

The cankers are in most cases of the sunken type and less frequent is the knobby type as described by Van Vliet. Sometimes are found the intermediate types between the sunken and knobby type of the canker. At a longer or shorter distance from the old cankers there are swellings sometimes only a few millimeters wide and sometimes again up to one centimeter, covered by undamaged bark. If the surface layers are removed it is found diseased tissue in the depth of the bark. As will be shown later these are formations of secondary character formed by the penetration of the bacteria from old cankers along the bark. In the beginning of the disease the cankers are often found near or around the leaf-scars, but there are also many primary or secondary cankers in the internodes. Very often is the case that the cankers are in a vertical line one below the other, what is comprehensible in regard the way the bacteria are spread by the rain along the stems and branches.

Very young cankers show at first only one or two splits in the periderm and in the cell-layers below it, but later the cross-splits appear and canker becomes open showing the browned and blackened tissues. In the more progressive stages the tissues of the bark are more and more broken down to the wood and the color of wood becomes blackish and browned, with many cracks and splits. At the same time the bark on the border of the canker is showing a more intensive growth and

hypertrophy, and also the year-rings in the vicinity of the canker are enlarged. In this way small cankers of the sunken type are formed in a year or two, but the large cankers with a diameter of 10—20 centimeters are formed only after longer periods of time (10—20—30 years).

The isolation of the causal organism has been made from suspension of the bacteria in sterile water. The suspension was prepared in the way, that small parts of the infected tissue was taken aseptically and crushed in sterile distilled water. With isolates originating from ashes from the different parts of the country inoculations were made by needle pricks in the bark of *Fraxinus excelsior*, *Fraxinus americana alba*, *Olea europea* and *Nerium oleander* with the result that infections were obtained only on the European ash (*Fraxinus excelsior*) and all the other remained healthy. The infections on the European ash produced typical small cankers, and sometimes especially if the infections were made in the old wood only scabby alteration of the surface of the bark resulted, but the bark tissues were deeply browned and the original organism in the both cases has been reisolated. The control plants remained unchanged and the needle pricks healed up in short time, what was the case with the infected plants, which did not contract the disease.

To find out whether the organism is able to penetrate the unwounded bark through lenticels many trials were made to infect the ash-plants by spraying them with bacterial suspension. For this purpose isolations from different ash-specimens were tried, but with no success.

The organism was cultivated on different media and compared with the cultures of olive and oleander organisms. This investigations demonstrated that the compared organisms show many similarities in morphological and cultural characters as they do also regarding their biochemical activities. The morphological and cultural characteristics of the ash-organism are in close agreement with that described by Miss Nellie Brown with the difference regarding the thermal death point and the fluoreescency of Ushynsky's solution.

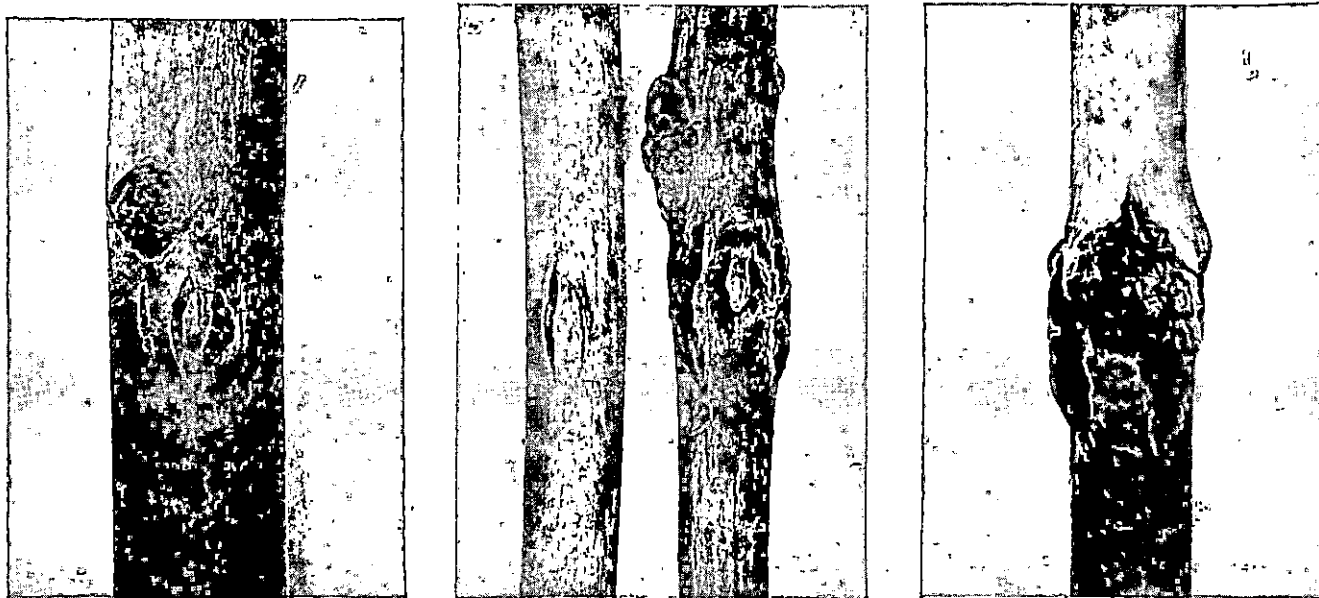
Although the differences between ash and olive organisms regarding their morphology and cultural characteristics are not large ones, the differences regarding their behaviour towards the plants they are able to infect, seem to justify the conclusion that the ash organism is a distinct species.

The new name and the synonyms would be as follows:
Pseudomonas Fraxini (Brown) Škor.

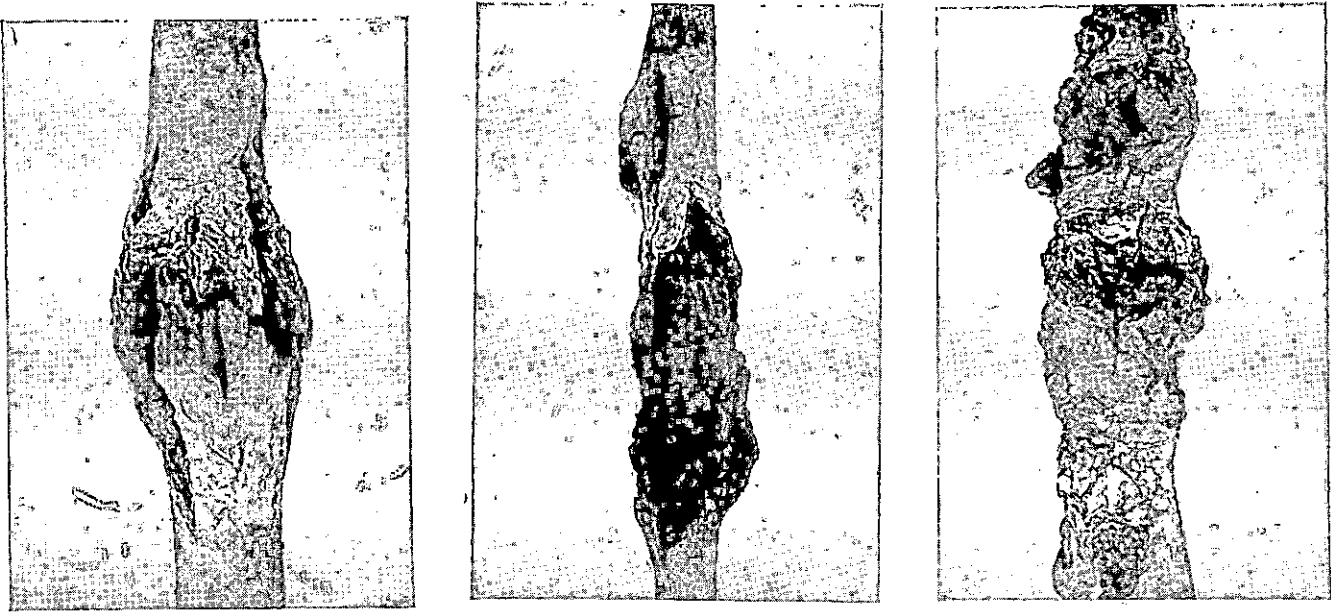
Tabla I



Jasenova stabla sa bakterijskim rakom. — The ash-trees with bacterial cankers.

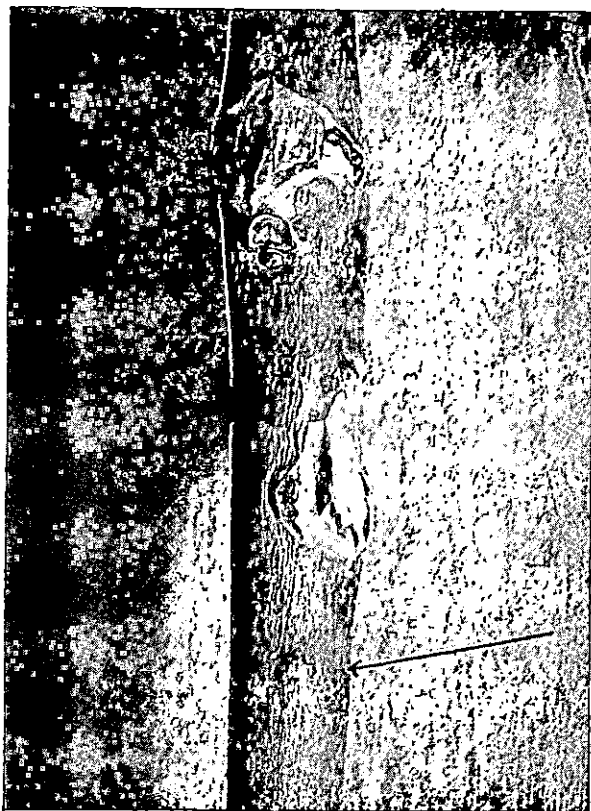


Razvojni stadiji jasenovog raka. – Different stages in the development of the sunken type of the ash-canker

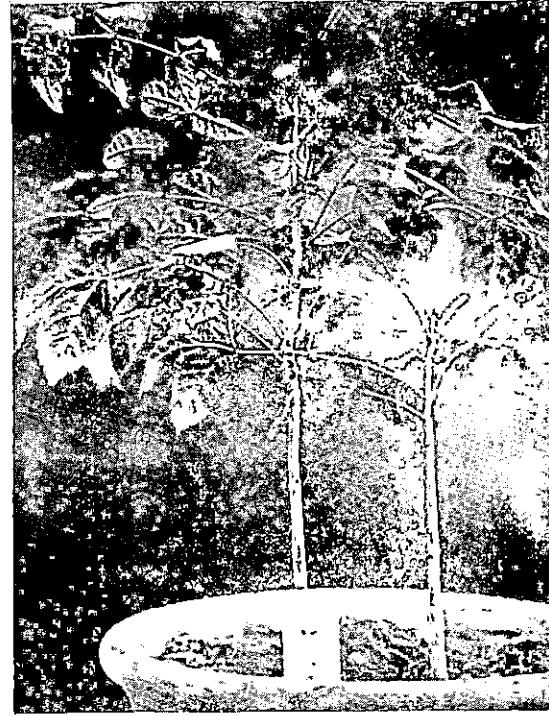


Razvojni stadiji jasenovog raka. — Different stages in the development of the sunken type of the ash-canker.

Tabla IV



Dva starija raka i prema kraju grane dva zametka sekundarnog raka.
— Two old cankers and two secondary cankers on the lower part of the branch.



Umjetno inficirani jaseni (8 dana nakon infekcije). — Artificially infected ashes (8 days after inoculation).



a)



b)

a) Mali rakovi mjesec dana nakon infekcije, b) Krastave promjene kore kad su inficirani stariji izbojci. —
 a) One month old cankers, b) Scabby alteration of the bark, when old shoots are infected.

Bacterium Savastanoi var. *fraxini* Brown.

Bacterium fraxini (Brown) Škor.

Phytomonas fraxini (Brown) Škor.

The studies on the diseased tissues and the distribution of bacteria were made on microtome sections stained by Stoughton's method. These studies have clearly shown that the bacteria are intercellular and that they are intracellular in damaged cells only. The abundant production of slime by the bacteria produces a very intensive pressure on the surrounding cells broadening the intercellular spaces and crushing the cells. That this pressure must be quite high is indicated by compression of the cells near the larger cavities. This is the way how the cavities are formed. Later, when the cells begin to die, the formation of wound periderm starts which increases the stresses in the tissues and in the same time a widening of already existing cavities follows. When one year old branches are infected bacterial invasion breaks through the woody elements to the pith causing the disintegration of the pith. In such cases there are often found tracheal elements filled with bacteria. The bacteria were found far enough in these elements, but whether they were able to cause some secondary canker formations it was not determined. The secondary cankers however are connected with infection channels through the cortex to the diseased tissues of older cankers. The hypertrophy and intensive division of the cells surrounding the bacterial cavities brings about the swelling of the bark and later also the splitting of periderm and superficial cell-layers. A detailed research of the anatomic changes in the older cankers was not undertaken because it has been already done by Van Vliet.

The observations made during the rainy weather lead to the conclusion, that the rain is the main agent in the spread of the disease. In such occasion it was possible to notice that bacteria ooze from the cankers and are rinsed down the branches, but also splashed on to the stems and branches of the ashes in the lower-story. This statement may be confirmed by the fact that the cankers on a stem are formed one below the other and also that there were infected only that underwood-ashes which were standing below the crown of an old diseased tree. The last mentioned fact explains why the infected ashes are found in groups, but at the same time that neither wind nor the insects play any role of significance in the spread of the disease.

A timely removal of infected trees from the growth is at present the only practical measure to prevent further spread of the disease in the ash-stands.