Uloga gljiva i gljivama sličnih organizama u odumiranju poljskoga jasena (Fraxinus angustifolia Vahl) u posavskim nizinskim šumama u Republici Hrvatskoj

Kranjec, Jelena

Doctoral thesis / Disertacija

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:108:239470

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-23**

Repository / Repozitorij:

University of Zagreb Faculty of Forestry and Wood Technology

Sveučilište u Zagrebu

ŠUMARSKI FAKULTET

Jelena Kranjec

ULOGA GLJIVA I GLJIVAMA SLIČNIH ORGANIZAMA U ODUMIRANJU POLJSKOGA JASENA (*Fraxinus angustifolia* Vahl) U POSAVSKIM NIZINSKIM ŠUMAMA U REPUBLICI HRVATSKOJ

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2017.

Sveučilište u Zagrebu

FACULTY OF FORESTRY

Jelena Kranjec

THE ROLE OF FUNGI AND FUNGUS-LIKE ORGANISMS IN DIEBACK OF NARROW-LEAVED ASH (*Fraxinus angustifolia* Vahl) IN POSAVINA LOWLAND FORESTS OF THE REPUBLIC OF CROATIA

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2017

Sveučilište u Zagrebu

ŠUMARSKI FAKULTET

Jelena Kranjec

ULOGA GLJIVA I GLJIVAMA SLIČNIH ORGANIZAMA U ODUMIRANJU POLJSKOGA JASENA (*Fraxinus angustifolia* Vahl) U POSAVSKIM NIZINSKIM ŠUMAMA U REPUBLICI HRVATSKOJ

DOKTORSKI RAD

Mentor: prof.dr.sc. Danko Diminić

Zagreb, 2017.

University of Zagreb

FACULTY OF FORESTRY

Jelena Kranjec

THE ROLE OF FUNGI AND FUNGUS-LIKE ORGANISMS IN DIEBACK OF NARROW-LEAVED ASH (*Fraxinus angustifolia* Vahl) IN POSAVINA LOWLAND FORESTS OF THE REPUBLIC OF CROATIA

DOCTORAL THESIS

Supervisor: prof. Danko Diminić, Ph.D.

Zagreb, 2017

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

TI (naslov)	Uloga gljiva i gljivama sličnih organizama u odumiranju poljskoga jasena (*Fraxinus angustifolia* Vahl) u posavskim nizinskim šumama u Republici Hrvatskoj
AU (autor)	Jelena Kranjec
AD (adresa)	Vladimira Nazora 59b, Sveti Ivan Zelina, Hrvatska, email: jkranjec@sumfak.hr
SO (izvor)	Šumarska knjižnica, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu Svetošimunska 25, 10002 Zagreb
PY (godina objave)	2017.
LA (izvorni jezik)	hrvatski
DE (ključne riječi)	*Fraxinus angustifolia*, odumiranje, gljive, gljivama slični organizmi
GE (zemlja objave)	Republika Hrvatska
PT (vrsta objave)	Doktorski rad
VO (obujam)	I – XVIII + 161 str. + 50 tablica + 35 slika + 341 literaturni navod
AB (sažetak)	Poljski jasen (*Fraxinus angustifolia* Vahl), gospodarski i ekološki vrlo značajna vrsta nizinskih šuma Hrvatske, posljednjih nekoliko godina pokazuje sve izraženije simptome odumiranja. Iako je na nekoliko lokacija u Republici Hrvatskoj u krošnjama osutih stabala utvrđena patogena gljiva *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya, još uvijek nije potvrđena kao primarni uzročnik odumiranja poljskoga jasena u nizinskim šumama već se smatra samo jednim od više različitih biotičkih i abiotičkih čimbenika koji sudjeluju u navedenom procesu. Svrha ovog istraživanja je bila ispitati ulogu ostalih gljiva te gljivama sličnih organizama u okolnom tlu te na korijenovom sustavu i donjem dijelu debla stabala poljskoga jasena kako bi se uz prijašnja istraživanja koja su se uglavnom odnosila na krošnju, dobio sveobuhvatan uvid u ulogu navedenih skupina organizama u odumiranju. Istraživanje je provedeno u prirodnim sastojinama sa simptomima odumiranja na tri različite lokacije, pri čemu su uzimani uzorci okolnog tla, korijena te donjeg dijela debla na ukupno 90 stabala svrstanih prema osutosti krošnje u tri kategorije zdravstvenog stanja. Iz navedenih su uzoraka izolirani miceliji gljiva i njima sličnih organizama koji su potom identificirani molekularnim metodama. U istraživanju je dobiveno ukupno 1497 izolata gljiva i njima sličnih organizama koji su molekularnim

analizama svrstani u 80 taksona, te prema načinu života i ishrane kategorizirani kao saprotrofi, endofiti i paraziti. Utvrđena distribucija identificiranih taksona s obzirom na različite kategorije uzorka, kategorije zdravstvenog stanja stabala te geografske lokacije uzorkovanja je pokazala specijalizaciju samo za određeni tip biljnog tkiva i supstrata. Izračunata je raznolikost (bogatstvo) vrsta pomoću Shannonovog indeksa raznolikosti te indeksa ujednačenosti, čije se vrijednosti nisu statistički značajno mijenjale za zajednice na stablima različitog zdravstvenog stanja. Statističkim je analizama utvrđeno kako je većina identificiranih taksona (77) jednako distribuirana na stablima različitog zdravstvenog stanja, dok je manji broj onih (69) koji su jednako distribuirani na različitim geografskim lokacijama uzorkovanja. Od značajnijih biotičkih čimbenika koji sudjeluju u odumiranju poljskoga jasena su na korijenu i bazi debla stabala utvrđene vrste *Hymenoscyphus fraxineus, Armillaria* spp., *Ganoderma adspersum, Fusarium solani* i *Diaporthe cotoneastri.* U tlu odumirućih sastojina nije potvrđena prisutnost patogenih vrsta roda *Phytophthora.* S obzirom na statistički značajnu povezanost razvoja nekroza na deblu i korijenu te osutosti krošnje, navedeni se parametar pokazao dobrim pokazateljem zdravstvenog stanja stabala.

KEY WORDS DOCUMENTATION

TI (Title)	The role of fungi and fungus-like organisms in dieback of narrow-leaved ash (*Fraxinus angustifolia* Vahl) in Posavina lowland forests of the Republic of Croatia
OT (Original title)	Uloga gljiva i gljivama sličnih organizama u odumiranju poljskoga jasena (*Fraxinus angustifolia* Vahl) u posavskim nizinskim šumama u Republici Hrvatskoj
AU (Author)	Jelena Kranjec
AD (Address of Author)	Vladimira Nazora 59b, Sveti Ivan Zelina, Hrvatska, email: jkranjec@sumfak.hr
SO (Source)	Library of forestry, Forestry faculty of Zagreb University Svetosimunska 25, 10002 Zagreb
PY (Publication year)	2017
LA (Text language)	Croatian
DE (Descriptors)	*Fraxinus angustifolia*, dieback, fungi, fungus-like organisms
GE (Geo. Headings)	Republic of Croatia
PT (Publication Type)	Doctoral Thesis
VO (Volume)	I – XVIII + 161 p. + 50 tables + 35 figures + 341 references
AB (Abstract)	Narrow-leaved ash (*Fraxinus angustifolia* Vahl), ecologically and economically very important species in lowland forests of the Republic of Croatia, has been showing more prominent symptoms of dieback. According to the crown defoliation monitoring data as a part of the ICP Forests program, narrow-leaved ash is currently the most damaged forest tree species in the Republic of Croatia, with more than 70% of trees with significantly defoliated crown in 2016. Although has the pathogenic fungus *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya been determined in the crowns of diseased trees in several locations, it has still not been confirmed as the primary cause of narrow-leaved ash dieback in the lowland forests and it is rather considered to be one of the multiple factors affecting the process. Goal of this research was to investigate the role of other fungi and fungus-like organisms present in the adjacent soil, tree roots and stem collars in the decline of this tree species.

Research has been conducted at three different locations in the natural stands affected by dieback during the growth period in 2016. Trees were categorized according to the crown defoliation in three different categories of health condition: 1) healthy - with crown defoliation < 25%; 2) with impaired health status - crown defoliation 26-60%; 3) declining - crown defoliation 61-99%. From total of 90 trees, 30 in each health category, samples of adjacent soil, root and stem collar were taken for the isolation of fungi and fungus-like organisms using conventional plating on artificial media method for the plant tissue and three different methods for the soil (soil dilution plate, soil plate and soil baiting method). Isolated mycelia were sorted into morphotypes according to their morphological characteristics. From each morphotype one to four representative isolates were chosen for the molecular identification of the species. In the second part of the research, 30 extra soil samples were taken from the vicinity of the part of already examined trees in order to detect the presence of pathogenic *Phytophthora* species using the soil baiting method and molecular methods for the species identification.

All of the soil samples, 86% of root and 85% of stem samples gave fungal growth. In average, three or four different taxa were found per tree, depending on the type of the sample. Research has resulted with total of 1497 isolates sorted into 80 taxa, of which 59 were identified to the species level. Identified taxa were categorized according to their known ecology noted in the various literature into endophytes, saprotrophs and parasites. Most of the taxa were found in just one sample type, indicating their specialization for different substrates. In contrast, most of the taxa were identified in all three health categories and sampling locations. Species diversity in different sample types, shown by Shannon diversity and Evenness indices, did not significantly differ among different health categories in observed locations. For the most taxa, there was no statistically significant difference in their distribution in different health categories. Analysis of taxa distribution among different sampling locations revealed significant difference for 11 taxa, three on stems, six on roots and two in soil, which can indicate different habitat conditions or temporal phases of the dieback process in the observed localities. In order to evaluate does crown defoliation reflect the health status of tree roots and

stems, connection between health category and presence of necroses in plant tissue was tested and the results justified its use for this purposes. Results of the second part of the research did not confirm the presence of pathogenic *Phytophthora* species in soils of declining stands, excluding them so far as the contributing factor to the decline.

Results of this research point out several conclusions. There is high abundance and diversity of taxa of fungi and fungus-like organisms in the soil, tree roots and tree stems in the declining narrow-leaved ash stands, where number of them are officially reported for the first time in the Republic of Croatia, and some of them could be completely new to science since they were not identified to the species level. In general, approximately equal numbers of isolates appointed to endophytes, saprotrophs and parasites are present in soil and trees. Communities of fungi and fungus-like organisms differ more among different sample types, since larger number of taxa seems to be specialized for specific substrate, whereas community compositions in different health categories and sampling localities are relatively similar. The fact that there was no significant difference in distribution of the most taxa in different health categories indicates that taxa present in healthy tissues tend to be primary colonizers of the tissue of impaired health due to some other factors. Although some of the taxa can be considered as opportunistic pathogens based on their equal frequency in tissues of different health categories and assertions found in literature, this assumptions have to be further investigated in order to confirm them. Among the identified taxa, ones with the most prominent role in the narrow-leaved ash decline in the roots and stems of the trees are considered to be *Hymenoscyphus fraxineus, Armillaria* spp., *Ganoderma adspersum, Fusarium solani* and *Diaporthe cotoneastri*.

KAZALO SADRŽAJA

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA I
KEY WORDS DOCUMENTATION III
KAZALO SADRŽAJA VI
KAZALO SLIKA IX
KAZALO TABLICA XI
KAZALO KRATICA XIV
PREDGOVOR I ZAHVALE XV
PODACI O MENTORU XVII
1. UVOD 1
1.1 Značaj poljskoga jasena kao šumske vrste drveća u Republici Hrvatskoj 1
1.2 Odumiranje poljskoga jasena u Republici Hrvatskoj kroz vrijeme 3
1.3 Uloga gljiva i gljivama sličnih organizama u odumiranju šumskog drveća 5
1.3.1 Pojam gljivama sličnih organizama u ovome istraživanju 5
1.3.2 Načini života i ishrane gljiva i gljivama sličnih organizama i pripadajuća uloga u šumskim ekosustavima 7
1.3.3 Uloga patogenih gljivama sličnih organizama roda *Phytophthora* 12
1.3.4 Napredak u istraživanju gljiva i gljivama sličnih organizama primjenom molekularnih metoda 14
1.4 Pregled dosadašnjih istraživanja uloge gljiva i gljivama sličnih organizama u odumiranju jasena (*Fraxinus* spp.) 16
1.5 Ciljevi i hipoteze istraživanja 22
2. MATERIJALI I METODE RADA 24
2.1 Područje istraživanja 24
2.2 Istraživanje pridolaska gljiva i gljivama sličnih organizama u okolnom tlu i na stablima različitog zdravstvenog stanja 28
2.2.1 Odabir stabala i procjena kategorije zdravstvenog stanja 28
2.2.2 Sakupljanje uzoraka na terenu 29
2.2.3 Izolacija gljiva i gljivama sličnih organizama iz uzoraka tla i biljnog tkiva 31
2.2.4 Identifikacija taksonomskih jedinica izoliranih organizama molekularnim metodama 33
2.2.5 Podjela identificiranih taksona u kategorije prema načinu života i ishrane te taksonomskom položaju 37
2.2.6 Statistička analiza podataka 38
2.3 Utvrđivanje prisutnosti potencijalno patogenih gljivama sličnih organizama iz roda *Phytophthora* u tlu 39

2.3.1 Uzorkovanje tla na terenu ... 40
2.3.2 Laboratorijska obrada uzoraka ... 40
2.3.3 Izolacija gljivama sličnih organizama iz simptomatičnih listova ... 41
2.3.4 Indukcija tvorbe sporangija ... 42
2.3.5 Identifikacija vrsta molekularnim metodama ... 43
3. REZULTATI ... 45
3.1 Identificirane taksonomske jedinice gljiva i gljivama sličnih organizama u okolnom tlu i na stablima različitog zdravstvenog stanja ... 45
3.1.1 Uspješnost izolacije iz različitih uzoraka ... 45
3.1.2 Uspješnost primjene molekularnih metoda u identifikaciji čistih kultura micelija ... 47
3.1.3 Identificirani taksoni gljiva i gljivama sličnih organizama i njihova kategorizacija prema načinu života i ishrane te sistematici ... 48
3.1.4 Identificirani taksoni koji obuhvaćaju više različitih vrsta ... 54
3.1.5 Distribucija identificiranih taksona s obzirom na kategoriju uzorka ... 55
3.1.6 Distribucija identificiranih taksona s obzirom na kategoriju zdravstvenog stanja stabala ... 59
3.1.7 Distribucija identificiranih taksona s obzirom na geografsku lokaciju uzorkovanja ... 63
3.1.8 Raznolikost zajednica gljiva i njima sličnih organizama ... 67
3.1.9 Analiza utjecaja identificiranih taksona na zdravstveno stanje stabala ... 72
3.1.10 Analiza povezanosti identificiranih taksona prisutnih u biljnom tkivu (korijen, deblo) sa zdravstvenim stanjem stabala ... 77
3.1.11 Analiza povezanosti identificiranih taksona s geografskim lokacijama uzorkovanja ... 80
3.1.12 Analiza osutosti krošnje kao pokazatelja zdravstvenog stanja stabla ... 87
3.2 Prisutnost potencijalno patogenih gljivama sličnih organizama u tlu ... 89
3.2.1 Uspješnost izolacije gljivama sličnih organizama iz tla ... 89
3.2.2 Identificirane taksonomske jedinice gljivama sličnih organizama u tlu ... 92
4. RASPRAVA ... 93
4.1 Utvrđena raznolikost gljiva i njima sličnih organizama ... 93
4.2 Identificirani taksoni gljiva i gljivama sličnih organizama i njihov utjecaj na zdravstveno stanje stabala ... 95
4.2.1 Uloga gljivama sličnih organizama rodova *Pythium* i *Phytopythium* ... 100
4.2.2 Uloga gljive *Fusarium solani* ... 101
4.2.3 Uloga gljive *Diaporthe cotoneastri* ... 101
4.2.4 Uloga vrsta roda *Armillaria* ... 102

4.2.5 Uloga gljive *Hymenoscyphus fraxineus* 104
4.2.6 Uloga gljive *Ganoderma adspersum* 105
4.2.7 Uloga gljive *Gibberella fujikuroi* 106
4.2.8 Uloga gljive *Aspergillus ruber* 106
4.2.9 Uloga gljive *Fusarium sporotrichioides* 106
4.2.10 Uloga gljive *Pholiota adiposa* 106
4.2.11 Uloga gljive *Dactylonectria vitis* 107
4.2.12 Uloga gljive *Leucostoma persoonii* 107
4.2.13 Uloga ostalih često izoliranih taksona gljiva i gljivama sličnih organizama ... 107
4.3 Povezanost identificiranih taksona s geografskim lokacijama uzorkovanja 110
4.4 Osutost krošanja kao pokazatelj zdravstvenog stanja stabala 112
4.5 Gljivama slični organizmi prisutni u tlu sastojina poljskog jasena sa simptomima odumiranja 113
5. ZAKLJUČCI 115
LITERATURA 120
PRILOZI 144
ŽIVOTOPIS 159
AUTORIČIN POPIS OBJAVLJENIH RADOVA I SUDJELOVANJA 160

KAZALO SLIKA

Slika 1. Areal poljskoga jasena u jugoistočnoj Europi (Fukarek 1954) 2

Slika 2. Dijagram mogućih odnosa između gljiva i biljaka te njihovih posljedica po oba organizma (Brundrett 2004) 8

Slika 3. Terenski dijagnostički test koji pokazuje pozitivan rezultat na prisustvo vrsta roda *Phytophthora* u ispitivanom tkivu 14

Slika 4. Grafički prikaz srednjih mjesečnih količina oborina i srednjih vrijednosti relativne vlažnosti zraka po mjesecima za razdoblje od 1961. do 1990. godine za istraživane gospodarske jedinice 25

Slika 5. Grafički prikaz srednjih mjesečnih temperatura zraka i prosječnog broja dana s mrazom po mjesecima za razdoblje od 1961. do 1990. godine za istraživane gospodarske jedinice 25

Slika 6. Lokacije uzimanja uzoraka (DS - Dugo Selo odsjek 16g; LIP 1-4 - Lipovljani odsjeci 74a, 74b, 80a, 71d; NOV - Novska odsjek 37b) 26

Slika 7. Kategorije zdravstvenog stanja 1, 2 i 3 stabala poljskoga jasena (gledano slijeva) 29

Slika 8. Uzimanje poduzoraka tla na četiri međusobno nasuprotne točke na rubu projekcije krošnje na tlo 30

Slika 9. Uzimanje uzoraka korijena i donjeg dijela debla 31

Slika 10. Dvije neposredne metode izolacije gljiva i GSO iz tla korištene u istraživanju 32

Slika 11. Neke od faza protokola za izolaciju genomske DNA: priprema 50 mg micelija, homogenizacija tkiva, pipetiranje pufera za lizu 34

Slika 12. Laboratorijska obrada uzoraka tla metodom potapanja 41

Slika 13. Primjer lisnog tkiva iz kojeg je vršena izolacija gljivama sličnih organizama 42

Slika 14. Indukcija tvorbe sporangija: nesterilne suspenzije tla različitih koncentracija (lijevo) i kockice hranjive podloge s micelijem u nesterilnoj suspenziji tla (desno) 43

Slika 15. Grafički prikaz postotnog udjela uzoraka korijena na kojima nije zabilježen rast micelija s obzirom na kategorije zdravstvenog stanja stabala i geografske lokacije uzorkovanja 45

Slika 16. Grafički prikaz postotnog udjela uzoraka donjeg dijela debla na kojima nije zabilježen rast micelija s obzirom na kategorije zdravstvenog stanja stabala i geografske lokacije uzorkovanja 46

Slika 17. Primjer dobivenih PCR produkata na agaroznim gelovima; NK = negativna kontrola; M = molekularni marker; brojke označavaju uzorke DNA 48

Slika 18. Udio dobivenih izolata prema kategorijama načina života i ishrane (lijevo) te sistematskoj pripadnosti odjelu (desno) 52

Slika 19. Krivulje akumulacije vrsta (taksona) prema kategorijama uzorka 55

Slika 20. Vennov dijagram zajedničkih i nedijeljenih taksona s obzirom na kategoriju uzorka 56

Slika 21. Krivulje akumulacije vrsta (taksona) prema kategorijama zdravstvenog stanja stabala 59

Slika 22. Vennov dijagram zajedničkih i nedijeljenih taksona s obzirom na kategoriju zdravstvenog stanja 60

Slika 23. Krivulje akumulacije vrsta (taksona) prema geografskim lokacijama uzorkovanja . 63

Slika 24. Vennov dijagram zajedničkih i nedijeljenih taksona s obzirom na geografsku lokaciju uzorkovanja 64

Slika 25. Grafički prikaz relativne povezanosti utvrđenih taksona gljiva na deblu s kategorijama zdravstvenog stanja stabala pomoću analize korespondencije 74

Slika 26. Grafički prikaz relativne povezanosti utvrđenih taksona gljiva na korijenu s kategorijama zdravstvenog stanja stabala pomoću analize korespondencije 75

Slika 27. Grafički prikaz relativne povezanosti utvrđenih taksona gljiva i gljivama sličnih organizama u tlu s kategorijama zdravstvenog stanja stabala pomoću analize korespondencije 76

Slika 28. Udio izolata pojedinih taksona kategoriziranih kao paraziti u ukupnom broju izolata svih taksona kategoriziranih kao paraziti u korijenu i donjem dijelu debla (u biljnom tkivu) stabala poljskoga jasena 77

Slika 29. Ukupni broj taksona i izolata zabilježenih u biljnom tkivu poljskoga jasena (deblo i korijen) prema kategorijama zdravstvenog stanja stabala 80

Slika 30. Grafički prikaz relativne povezanosti utvrđenih taksona gljiva na deblu s geografskim lokacijama uzorkovanja pomoću analize korespondencije 83

Slika 31. Grafički prikaz relativne povezanosti utvrđenih taksona gljiva na korijenu s geografskim lokacijama uzorkovanja pomoću analize korespondencije 85

Slika 32. Grafički prikaz relativne povezanosti utvrđenih taksona gljiva i gljivama sličnih organizama u tlu s geografskim lokacijama uzorkovanja pomoću analize korespondencije ... 86

Slika 33. Broj stabala sa zabilježenim simptomima na donjem dijelu debla po kategorijama zdravstvenog stanja 88

Slika 34. Broj stabala sa zabilježenim simptomima na korijenu po kategorijama zdravstvenog stanja 88

Slika 35. Neki od sporangija dobivenih potapanjem micelija nesterilnim suspenzijama tla ... 90

KAZALO TABLICA

Tablica 1. Udio stabala poljskoga jasena u različitim kategorijama osutosti krošnje za vremensko razdoblje od 2006. do 2016. godine (Potočić i sur. 2017) 4

Tablica 2. Sažet pregled klasifikacije unutar odjela *Oomycota* (Beakes i sur. 2014) 6

Tablica 3. Zajednička i jedinstvena svojstva pripadnika carstva *Fungi* i odjela *Oomycota* (Rossman i Palm 2006) 7

Tablica 4. Osnovni podaci o sastojinama u kojima je izvršeno uzorkovanje preuzeti iz važećih osnova gospodarenja 27

Tablica 5. Kategorije osutosti krošanja, odnosno zdravstvenog stanja stabala s obzirom na postotak gubitka lišća 28

Tablica 6. Sastav smjese za izvođenje PCR reakcije 35

Tablica 7. Uvjeti lančane reakcije polimerazom 35

Tablica 8. Prilagodba uvjeta i/ili komponenata prvotne PCR reakcije 36

Tablica 9. Formule korištenih indeksa raznolikosti u istraživanju 39

Tablica 10. Najmanji, najveći i prosječan broj izolata i taksona po stablu za različite kategorije uzorka, kategorije zdravstvenog stanja i geografske lokacije uzorkovanja 46

Tablica 11. Podaci o količini i kakvoći izolirane DNA 47

Tablica 12. Identificirani taksoni kategorizirani kao paraziti te njihova učestalost u pojedinim kategorijama uzorka (broj stabala na kojima su utvrđeni / broj dobivenih izolata) 49

Tablica 13. Identificirani taksoni kategorizirani kao endofiti te njihova učestalost u pojedinim kategorijama uzorka (broj stabala na kojima su utvrđeni / broj dobivenih izolata) 49

Tablica 14. Identificirani taksoni kategorizirani kao saprotrofi te njihova učestalost u pojedinim kategorijama uzorka (broj stabala na kojima su utvrđeni / broj dobivenih izolata) 51

Tablica 15. Identificirani taksoni za koje nije bilo moguće odrediti kategoriju načina života i ishrane na temelju dostupne literature te njihova učestalost u pojedinim kategorijama uzorka (broj stabala na kojima su utvrđeni / broj dobivenih izolata) 52

Tablica 16. Popis vrsta utvrđenih u ovom istraživanju koje su prema dostupnoj literaturi i ranije zabilježene u Republici Hrvatskoj 53

Tablica 17. Sørensenovi indeksi sličnosti s obzirom na kategoriju uzorka 57

Tablica 18. Popis taksona koji su zabilježeni u samo jednoj od tri analizirane kategorije uzorka 57

Tablica 19. Popis taksona koji su zabilježeni u dvije od tri analizirane kategorije uzorka 58

Tablica 20. Popis taksona koji su zabilježeni u sve tri kategorije uzorka 58

Tablica 21. Sørensenovi indeksi sličnosti s obzirom na kategorije zdravstvenog stanja stabala 60

Tablica 22. Popis taksona koji su zabilježeni u samo jednoj od tri kategorije zdravstvenog stanja stabala 61

Tablica 23. Popis taksona koji su zabilježeni u dvije od tri kategorije zdravstvenog stanja stabala 61

Tablica 24. Taksoni koji su zabilježeni u sve tri kategorije zdravstvenog stanja stabala 62

Tablica 25. Sørensenovi indeksi sličnosti s obzirom na geografske lokacije uzorkovanja 64

Tablica 26. Popis taksona koji su zabilježeni na samo jednoj od tri istraživane geografske lokacije 65

Tablica 27. Popis taksona koji su zabilježeni na dvije od tri istraživane lokacije 66

Tablica 28. Popis taksona koji su zabilježeni na sve tri istraživane geografske lokacije 66

Tablica 29. Vrijednosti indeksa ujednačenosti i Shannonovog indeksa za zajednice gljiva i njima sličnih organizama na različitim kategorijama uzorka i zdravstvenog stanja stabala u GJ Črnovščak šumarije Dugo Selo 68

Tablica 30. Vrijednosti indeksa ujednačenosti i Shannonovog indeksa za zajednice gljiva i njima sličnih organizama na različitim kategorijama uzorka i zdravstvenog stanja stabala u GJ Josip Kozarac šumarije Lipovljani 68

Tablica 31. Vrijednosti indeksa ujednačenosti i Shannonovog indeksa za zajednice gljiva i njima sličnih organizama na različitim kategorijama uzorka i zdravstvenog stanja stabala u GJ Trstika šumarije Novska 68

Tablica 32. Popis taksona zabilježenih u Dugom Selu prema kategoriji uzorka i zdravstvenog stanja stabala 69

Tablica 33. Popis taksona zabilježenih u Lipovljanima prema kategoriji uzorka i zdravstvenog stanja stabala 70

Tablica 34. Popis taksona zabilježenih u Novskoj prema kategoriji uzorka i zdravstvenog stanja stabala 71

Tablica 35. Izračunate p vrijednosti primjenom Fisherovog egzaktnog testa za taksone identificirane na deblu, korijenu i okolnom tlu s obzirom na kategoriju zdravstvenog stanja stabala 72

Tablica 36. Broj stabala u svakoj od kategorija zdravstvenog stanja na kojima se takson javlja prema opaženim frekvencijama (broju izolata) za *Armillaria* spp. i *Coprinellus disseminatus* 73

Tablica 37. Broj stabala u svakoj od kategorija zdravstvenog stanja na kojima se takson javlja prema opaženim frekvencijama (broju izolata) za *Cladosporium cladosporioides* 76

Tablica 38. Broj dobivenih izolata taksona kategoriziranih kao paraziti u biljnom tkivu (korijen, deblo) s obzirom na kategorije zdravstvenog stanja stabala 78

Tablica 39. Broj dobivenih izolata taksona kategoriziranih kao saprotrofi u biljnom tkivu (korijen, deblo) s obzirom na kategorije zdravstvenog stanja stabala 78

Tablica 40. Broj dobivenih izolata taksona kategoriziranih kao endofiti u biljnom tkivu (korijen, deblo) s obzirom na kategorije zdravstvenog stanja stabala 79

Tablica 41. Izračunate p vrijednosti primjenom Fisherovog egzaktnog testa za taksone identificirane na deblu, korijenu i okolnom tlu s obzirom na geografsku lokaciju uzorkovanja 81

Tablica 42. Broj stabala na svakoj od geografskih lokacija na kojima se takson javlja prema opaženim frekvencijama (broju izolata) za *Diaporthe cotoneastri* i *Nemania serpens* 82

Tablica 43. Broj stabala na svakoj od geografskih lokacija na kojima se takson javlja prema opaženim frekvencijama (broju izolata) za *Penicillium* sp.1 83

Tablica 44. Broj stabala na svakoj od geografskih lokacija na kojima se takson javlja prema opaženim frekvencijama (broju izolata) za *Absidia* sp. i *Cladosporium cladosporioides* 84

Tablica 45. Broj stabala na svakoj od geografskih lokacija na kojima se takson javlja prema opaženim frekvencijama (broju izolata) za *Armillaria* spp. i *Ganoderma adspersum* 84

Tablica 46. Broj stabala na svakoj od geografskih lokacija na kojima se takson javlja prema opaženim frekvencijama (broju izolata) za *Coprinellus micaceus* 85

Tablica 47. Broj stabala na svakoj od geografskih lokacija na kojima se takson javlja prema opaženim frekvencijama (broju izolata) za *Trichoderma* spp. 85

Tablica 48. Broj stabala na svakoj od geografskih lokacija na kojima se takson javlja prema opaženim frekvencijama (broju izolata) za *Gibberella fujikuroi* i *Fusarium solani* 87

Tablica 49. Pregled uzoraka tla, uspješnosti izolacije gljivama sličnih organizama te indukcije tvorbe sporangija na dobivenim čistim kulturama micelija 91

Tablica 50. Identificirane vrste gljivama sličnih organizama u tlu odumirućih sastojina poljskoga jasena 92

KAZALO KRATICA

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CJA	Carrot Juice Agar
DMSO	Dimetil-sulfoksid
DNA	Deoksiribonukleinska kiselina (Deoxyribonucleic Acid)
DS	Dugo Selo
EDTA	Etilendiamintetraoctena kiselina
GJ	Gospodarska jedinica
GSO	Gljivama slični organizmi
ICP Forests	Međunarodni program za procjenu i motrenje utjecaja zračnog onečišćenja na šume
ITS	Internal Transcribed Spacer (unutarnja prijepisna razmaknica)
LIP	Lipovljani
MEA	Malt Extract Agar
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NOV	Novska
pb	parovi baza
PCR	Polymerase Chain Reaction (lančana reakcija polimerazom)
PDA	Potato Dextrose Agar
RNA	Ribonukleinska kiselina (Ribonucleic Acid)
SDS	Natrijev dodecil sulfat
TBE	Tris-borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris(hidroksimetil)aminometan
UŠP	Uprava šuma podružnica
VJA	Vegetable Juice Agar

PREDGOVOR I ZAHVALE

Ovaj doktorski rad je rezultat istraživanja provedenih u sklopu projekta financiranog sredstvima poduzeća Hrvatske šume d.o.o. pod nazivom „Ekologija i obnova poplavnih šuma Posavine“, čiji je voditelj prof. dr. sc. Boris Hrašovec, te projekta financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom “Uloga biotičkih čimbenika na vitalitet poljskog jasena (*Fraxinus angustifolia* Vahl) u poplavnim šumama Hrvatske”, čiji je voditelj prof. dr. sc. Josip Margaletić. Rad je izrađen na Zavodu za zaštitu šuma i lovno gospodarenje na Šumarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Prije svega se želim zahvaliti prof. dr. sc. Milanu Oršaniću, jer mi je svojim zalaganjem za stvaranje novih radnih mjesta za mlade znanstvenike, pružio priliku i omogućio da napravim ovaj korak. Veliko hvala i dekanu, prof. dr. sc. Vladimiru Jambrekoviću, koji je tijekom tri godine podržavao moje zaposlenje u većoj mjeri omogućeno sredstvima Fakulteta.

Iznimno sam zahvalna svim kolegicama i kolegama sa Zavoda za zaštitu šuma i lovno gospodarenje koji su me prihvatili od prvog radnog dana, počevši od prof. dr. sc. Borisa Hrašovca i prof. dr. sc. Josipa Margaletića, koji su me bezrezervno primili na svoje projekte i tako mi omogućili potrebna sredstva za istraživanja, ali mi uz to i uvijek bili spremni pomoći podrškom ili savjetom, baš kao i prof. dr. sc. Marijan Grubešić, izv. prof. dr. sc. Krešimir Krapinec te naravno svi članovi „mlade ekipe“, doc. dr. sc. Milivoj Franjević, dr. sc. Kristijan Tomljanović, dr. sc. Marko Vucelja, dr. sc. Linda Bjedov i dr. sc. Marno Milotić. Na svim očinskim i majčinskim savjetima te bezbrojnim trenucima smijeha, veliko i posebno hvala Leopoldu Cvetanu, Marijani Mrvelj i Nevenki Magovac.

Posebno i neizmjerno hvala prof. dr. sc. Danku Diminiću, mome mentoru na doktorskom studiju, čiji su mi podrška i povjerenje tijekom izrade ovog rada i omogućili da ga uspješno završim. Profesore, hvala Vam na svakoj smjernici i savjetu kojima ste osigurali da ne skrenem s pravog puta.

Bez pomoći ostalih kolegica i kolega sa Šumarskog fakulteta, Šumarskog instituta, Prirodoslovno-matematičkog i Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu bi izrada ovog rada bila znatno zahtjevnija.

Stoga zahvaljujem prof. dr. sc. Anamariji Jazbec na iznimnom strpljenju i pomoći oko statističkih analiza prikupljenih podataka te akademiku prof. dr. sc. Igoru Aniću, što mi je uvijek bio spreman pomoći savjetom i ustupanjem relevantne literature.

Doc. dr. sc. Viboru Roji, Brigiti Lacković i Petru Šutalu veliko hvala za sve savjete iz područja kemije te ustupanju „svojih“ laboratorijskih uređaja kada god mi je to bilo potrebno, kao i izv. prof. dr. sc. Saši Bogdanu koji mi je bez zadrške pomogao u savladavanju rukovanja uređajima u Molekularno-biološkom laboratoriju.

Zahvaljujem doc. dr. sc. Ernestu Goršiću na demonstraciji pravilnog rukovanja Presslerovim svrdlom, dr. sc. Karlu Beljanu na podučavanju radu u računalnim programima koji su mi znatno olakšali pisanje te dr.sc. Ivici Papi na stalnoj podršci i savjetima u vezi tehničkog uređenja rada.

Zahvaljujem svojim mladim kolegama, Ivanu Andriću, mag. ing. silv., Sanji Mrmić, mag. ing. silv. i Ivanu Lukiću, mag. ing. silv., s kojima sam od prvog dana studija zajedno lakše savladavala sve administrativne začkoljice, polagala ispite i koji su me svojim entuzijazmom uvijek dodatno motivirali.

Iznimno sam zahvalna kolegicama i kolegama koji su me vodili kroz svijet molekularnih analiza te uvijek strpljivo pružali savjete i odgovarali na moja brojna pitanja. Stoga hvala prof. dr. sc. Mirni Ćurković Perica i doc. dr. sc. Marinu Ježiću što su mi pomogli napraviti prve korake, Maji Perić, mag. ing. mol. biol. iz tvrtke Inovagen što mi je pomogla izbrusiti sakupljena znanja te dr. sc. Nikoli Lackoviću na detaljnim objašnjenjima i pomoći oko rukovanja DNA uzorcima. Osobito sam zahvalna izv. prof. dr. sc. Edyti Đermić, koja je unatoč neprekidnim obavezama uvijek našla vremena za savjetovati me i pružiti mi pomoć.

Veliko hvala i djelatnicima uprava šuma i šumarija što su mi omogućili istraživanje na njihovom području te mi uvijek spremno ustupali sve tražene podatke: Ivanu Krajačiću, dipl. ing. šum., Suzani Penić, dipl .ing. šum., Radmili Đurić Čikić, dipl. ing. šum., Dinku Hace, dipl. ing. šum., Danijelu Kokotu, dipl. ing. šum., Renati Barilar, dipl. ing. šum te Nikoli Pavičiću, dipl. ing. šum.

Naposljetku, najveću zahvalnost želim iskazati onima koji su najzaslužniji za postojanje ovoga rada jer su ga svaki trenutak proživljavali zajedno sa mnom, mojoj majci Marici, ocu Željku, bratu Ivanu i mome Anti. Ovaj rad posvećujem vama.

PODACI O MENTORU

Prof. dr. sc. Danko Diminić rođen je 1961. godine u Zagrebu. Osnovnu školu pohađa u Labinu, gdje 1980. godine završava i srednju školu stekavši zvanje suradnika u nastavi. Studij šumarstva na Šumarskom odjelu Šumarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu završava 1989. godine diplomskim radom "Životni ciklus nekih gljiva uzročnika osipanja iglica četinjača u nas". Poslijediplomski studij iz područja zaštita šuma završava 1993. godine na Šumarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, znanstvenim magistarskim radom "Prilog poznavanju mikoza borovih kultura u Istri" pod vodstvom prof. dr. sc. Milana Glavaša. Godine 1997. doktorirao je na Šumarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, iz područja biotehničkih znanosti, polje šumarstvo, grana zaštita šuma, obranivši doktorski rad "Istraživanje gljive *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko et Sutton na borovima u Hrvatskoj" pod vodstvom prof. dr. sc. Milana Glavaša.

Od ožujka do prosinca 1989. godine zaposlen je u Šumarskom institutu u Jastrebarskom gdje radi na poslovima zaštite šuma. Od 1990.-1993. godine zaposlen je na Šumarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, u Katedri za zaštitu šuma kao mlađi istraživač. Od 1993.-1997. radi kao asistent na predmetu Šumarska fitopatologija, a od 1997.-1998. kao viši asistent. U znanstveno-nastavno zvanje docent na predmetu Šumarska fitopatologija izabran je 1998., a 2003. ponovno je izabran u isto zvanje na predmetima Šumarska fitopatologija i Zaštita šuma na Šumarskom Fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. U znanstveno zvanje viši znanstveni suradnik izabran je 2005., a u znanstveno-nastavno zvanje izvanredni profesor 2007. godine. U znanstveno zvanje znanstveni savjetnik u znanstvenom području biotehničkih znanosti, polje šumarstvo, grana zaštita šuma izabran je 2009., a u znanstveno-nastavno zvanje redoviti profesor 2011. godine, te 2016. godine izabran je u trajno zvanje redovitog profesora.

Nastavnik je na preddiplomskim, diplomskim i poslijediplomskim studijima Šumarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, od 1999-2005. na 9 kolegija i od 2005. na 8 kolegija. Na poslijediplomskom studiju Gozdarstvo in obnovljivi gozdni viri, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, bio je sunositelj predmeta „Gozdna fitopatologija" u razdoblju akad. god. 2001/2002. do 2009/2010.

U razdoblju od 01. listopada do 25. prosinca 1995. boravi u Instituut voor Bosen Natuuronderzoek (IBN-DLO) Wageningen, Nizozemska (današnja Alterra). Tijekom znanstvenog i stručnog boravka savladava moderne laboratorijske metode u fitopatologiji i mikologiji, te radi na istraživanju gljive *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko et Sutton u okviru

teme svoje doktorske disertacije. Bio je gost krajobraznog projektnog biroa Nieuwland Advies iz Wageningena. U razdoblju od 23. rujna do 08. listopada 2001. je u sklopu COST akcije E12, Urban Forests and Trees, boravio u Instituto Madrileño de Investigacion Agraria y Amlimentaria (IMIA) u Madridu (Španjolska).

Bio je voditelj 7 nacionalnih znanstveno-istraživačkih projekta i suradnik na njih 10. Trenutno je voditelj jednog nacionalnog znanstveno-istraživačkog projekta te suradnik na dva projekta. Sudjelovao je u radu više međunarodnih i nacionalnih skupova u Europi i Hrvatskoj, od toga aktivno prezentiravši rezultate vlastitih ili timskih istraživanja na 13 međunarodnih znanstvenih skupova (14 priopćenja) i 22 nacionalna znanstvena skupa (29 priopćenja).

Od akademske godine 2005./2006. voditelj je diplomskog studija Urbano šumarstvo, zaštita prirode i okoliša na Šumarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 2009. godine predstavnik je Republike Hrvatske u European Mycological Network (EMN). Član je Povjerenstva za utvrđivanje kriterija i potvrdu izbora u zvanja Vijeća biotehničkog područja od 2013., te član Povjerenstva Sveučilišta u Zagrebu za akademsko priznavanje inozemnih visokoškolskih kvalifikacija (IVK) od prosinca 2014. U akad. god. 2014./2015. i 2015./2016. obnaša dužnost Prodekana za međunarodnu suradnju Šumarskog fakulteta.

Član je Akademije šumarskih znanosti (izvanredni član), Hrvatskog šumarskog društva, Hrvatskog društva biljne zaštite, British Mycological Society i European Mycological Network. Član je upravnih odbora dviju COST Akcija FP1102 DIAROD i FP1103 FRAXBACK. Kao član European Mycological Network (EMN) sudjelovao je 2009., 2011. i 2013. u izradi 18 protokola za dijagnosticiranje fitopatogenih gljiva u okviru European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) - Diagnostic Protocols for Fungi.

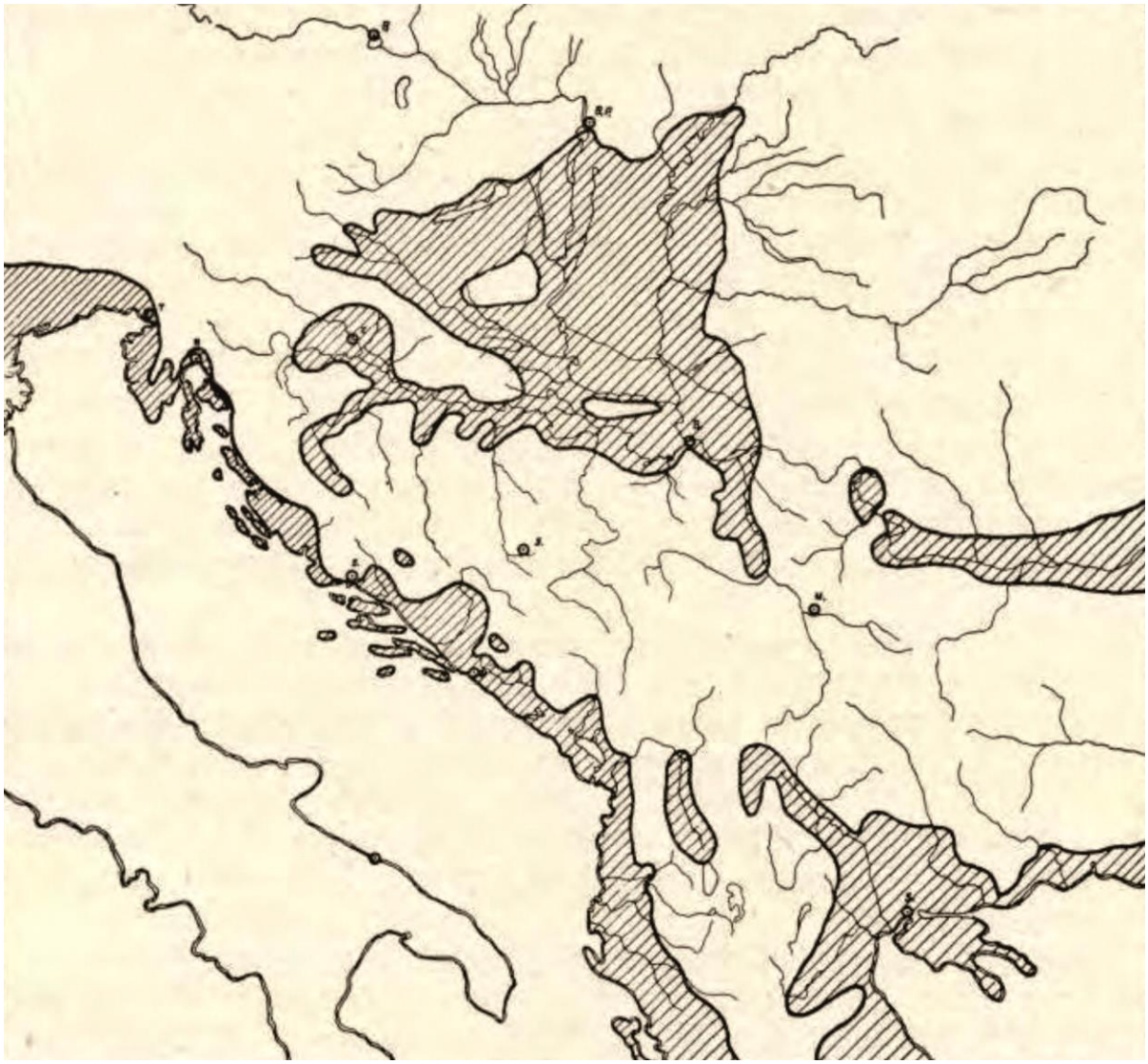
Objavio je 49 znanstvenih radova i to: 18 radova iz skupine a1; 16 iz skupine a2; 1 rad iz skupine a3; te 14 radova koji nisu indeksirani u navedenim skupinama. Koautor je jednog sveučilišnog priručnika i četiri znanstvene knjige. Aktivno se služi engleskim jezikom.

1. UVOD

1.1 Značaj poljskoga jasena kao šumske vrste drveća u Republici Hrvatskoj

U Republici Hrvatskoj je poljski jasen (*Fraxinus angustifolia* Vahl) prvi puta detaljno opisan pedesetih godina dvadesetog stoljeća (Fukarek 1952, 1954, 1955, 1956, 1957), kada se kao šire područje njegova rasprostranjenja navode južna i jugozapadna Europa, sjeverna Afrika i zapadna Azija te donose prvi podaci o njegovom arealu unutar države (Slika 1). Poljski jasen u dolinama velikih rijeka i njihovih pritoka u središnjoj Europi, Panonskom bazenu te Balkanu tvori kontinuirane i veće komplekse nizinskih poplavnih šuma, dok je distribucija vrste u mediteranskom području fragmentirana i reducirana na manje i izoliranije populacije na sušim staništima na većim nadmorskim visinama ili u barskim područjima (FRAXIGEN 2005, Bogdan i sur. 2007, Temunović i sur. 2012). Tako su i u Republici Hrvatskoj šume poljskoga jasena najvećim dijelom rasprostranjene u poplavnim područjima Posavine, pokupske zavale, bjelovarske zavale i Podravine, s najvećim kompleksima u gornjoj Posavini, gdje uspijeva približno 80 % jasenovih sastojina (Anić 2001). Optimalna faza sastojina poljskoga jasena je predstavljena šumskom zajednicom *Leucoio-Fraxinetum angustifoliae* Glav. 1959, to jest, šumom poljskoga jasena s kasnim drijemovcem, koja se rasprostire na glinenim aluvijalnim terenima od Siska do Spačve te u česmanskom području, Turopoljskom lugu i većem dijelu Pokuplja, s najvećim i najljepšim površinama u lipovljanskim posavskim šumama te kod Jasenovca i Novske (Glavač 1959, Rauš 1987). Osim u čistim sastojinama, kao karakteristična vrsta asocijacije pridolazi i u šumama hrasta lužnjaka s velikom žutilovkom (*Genisto elatae-Quercetum* roboris) te hrasta lužnjaka i običnoga graba (*Carpino betuli-Quercetum roboris*) (Anić 1996).

Prema prvoj nacionalnoj inventuri šuma Republike Hrvatske (Čavlović 2010) je na temelju temeljnice uzorkovanih stabala utvrđeno kako poljski jasen zauzima 72.690 ha, odnosno 3,06 % ukupne obrasle površine šuma, s ukupnom drvnom zalihom od 17.619.000 m^3, što ga uz hrast lužnjak (*Quercus robur* L.) čini najzastupljenijom vrstom drveća u poplavnim nizinskim šumama. Suvisla površina koju zauzimaju prirodne sastojine poljskoga jasena u Posavini iznosi gotovo 28.000 ha (Anić 2001, Prpić i sur. 2005).



Slika 1. Areal poljskoga jasena u jugoistočnoj Europi (Fukarek 1954)

Poljski jasen je u nizini značajan kao pionirska vrsta drveća (iako pokazuje neke osobine prijelazne vrste), koja uspijeva u rasponu od barskih staništa gdje tvori barsku granicu šume prema močvari do svježih mikrouzvisina (greda), pokazujući eurivalentnost s obzirom na nizinski nanoreljef, mikroreljef i mezoreljef (Anić 1996, 2001). Pri odumiranju hrasta lužnjaka u zajednici *Genisto elatae-Quercetum roboris* uslijed promjena u biotopu, poljski jasen te dijelom i crna joha (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) preuzimaju glavnu ulogu u biološkoj sanaciji staništa, odnosno dok se u procesu sukcesije ne stvore stanišni uvjeti za ponovni pridolazak klimatogene vrste (Matić i Skenderović 1993). Novija istraživanja navode kako se poljski jasen također pokazao izvrsnom vrstom za pošumljavanje dunavskih ada i ritova (Mayer i Hećimović 2008).

Poljski jasen je osim toga cijenjena i tražena gospodarska vrsta, koja u pojedinim razdobljima postiže cijenu kao i hrast lužnjak (Vukelić i Rauš 1998). I u prošlosti su drvo poljskoga jasena

sa širokom uporabom u kolarstvu, tokarstvu te izradi poljoprivrednih alata, kao i lišće za deficitarnu ishranu stoke, bili iznimno cijenjeni (Fukarek 1954).

Uz gospodarske, šume poljskoga jasena pružaju i višestruke općekorisne funkcije, uključujući hidrološku, vodozaštitnu, protuerozijsku, klimatsku, protuimisijsku, estetsku, zdravstvenu, rekreacijsku, turističku, genetsku i fiziološku (ponori ugljika) funkciju, kao i uloge u očuvanju bioraznolikosti i zaštiti prirode. Procjenjuje se kako ukupna vrijednost navedenih funkcija za šume poljskoga jasena iznosi 6.395.820.000 HRK (Prpić i sur. 2005).

1.2 Odumiranje poljskoga jasena u Republici Hrvatskoj kroz vrijeme

O odumiranju poljskoga jasena u prošlosti u Republici Hrvatskoj postoje sporadični zapisi. Prvo veće zabilježeno odumiranje se dogodilo u periodu između 1943. i 1947. godine uglavnom u srednjedobnim sastojinama (50 – 70 godina) (Spaić 1955, 1986), kada je na pojedinim lokacijama (šumarije Strošinci, Županja, Stari Mikanovci, Rajić) simptome odumiranja koji su se širili s vrha na čitavu krošnju pokazivalo više od 50 % jasenovih stabala. Autor pojavu objašnjava vremenskim preklapanjem plavljenja sastojina s intenzivnijom defolijacijom uzrokovanom jasenovom pipom (*Stereonychus fraxini* Deg), zbog čega je dolazilo do prekida stupaca vode u trahejama i stabla nisu bila u mogućnosti transpirirati višak vode iz tla. Kao biotski čimbenici koji s još nerazjašnjenom ulogom sudjeluju u odumiranju se spominju i veliki i mali jasenov potkornjak (*Hylesinus crenatus* Fab. i *Hylesinus fraxini* Panz.).

U Republici Hrvatskoj se od 1987. godine prati oštećenost šumskih sastojina u sklopu Međunarodnog programa za procjenu i motrenje utjecaja zračnog onečišćenja na šume (ICP Forests), gdje se, uz ostale glavne vrste drveća, prati i osutost krošanja poljskoga jasena. Prvim provedenim monitoringom je utvrđeno kako je poljski jasen na četvrtom mjestu po osutosti šumskih vrsta drveća sa 35 % stabala značajno osute krošnje (> 25 %), gdje je svako drugo osmatrano stablo na području UŠP Vinkovci pokazalo osutost, kao i značajan udio stabala na području UŠP Bjelovar (22 %) i UŠP Karlovac (45 %) (Prpić i sur. 1988).

Daljnjim je praćenjima ustanovljeno smanjenje udjela stabala poljskoga jasena značajne osutosti krošnje (10,34 – 10,99 %), ali se i dalje navodio kao najosjetljivija vrsta drveća nizinskih šuma uz hrast lužnjak (Prpić i sur. 1991). Iste je godine utvrđeno kako je najintenzivnije sušenje poljskoga jasena u Europi zabilježeno upravo u Republici Hrvatskoj (Harapin 1991). Pojava se smatrala posljedicom djelovanja više različitih čimbenika, od kojih

su autori isticali klimatske promjene, hidromelioracijske zahvate te gradaciju populacije jasenove pipe.

Prema podacima od 2006. godine pa do danas, udio značajno osutih stabala poljskoga jasena se uglavnom kretao od približno 10 do 20 %, sve do 2014. godine kada se naglo udvostručava te u 2016. raste na čak 72,22 %, čineći ga trenutno šumskom vrstom drveća najlošijeg zdravstvenog stanja u Republici Hrvatskoj (Tablica 1) (Potočić i sur. 2017). Iako je na nekoliko lokacija u Republici Hrvatskoj u krošnjama osutih stabala poljskog i običnog jasena (*Fraxinus excelsior* L.) utvrđena patogena gljiva *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya (Diminić 2015, Milotić i sur. 2016), još uvijek nije potvrđena kao primarni uzročnik odumiranja poljskoga jasena u nizinskim šumama već se smatra samo jednim od više različitih biotičkih i abiotičkih čimbenika koji sudjeluju u navedenom procesu.

Tablica 1. Udio stabala poljskoga jasena u različitim kategorijama osutosti krošnje za vremensko razdoblje od 2006. do 2016. godine (Potočić i sur. 2017)

Godina	Kategorije osutosti, %				Značajno osuto
	0	1	2	3 + 4	2 + 3 + 4
2006	65,43	29,63	3,70	1,23	4,94
2007	58,02	33,33	8,64	0,00	8,64
2008	61,25	30,00	8,75	0,00	8,75
2009	44,44	34,72	18,06	2,78	20,83
2010	52,11	32,39	14,08	1,41	15,49
2011	49,30	33,80	15,49	1,41	16,90
2012	33,33	54,17	12,50	0,00	12,50
2013	18,06	58,33	22,22	1,39	23,61
2014	14,55	36,36	45,45	3,64	49,09
2015	15,28	22,22	50,00	12,50	62,50
2016	11,11	16,67	61,11	11,11	72,22

Izvan područja Republike Hrvatske postoji malo javno dostupnih zapisa o odumiranju poljskoga jasena. Navodi se kako je u umjetno podignutim šumama poljskoga jasena u dolini rijeke March u istočnoj Austriji primijećeno intenzivno odumiranje stabala sa izraženim simptomima u krošnji, kao što su nekroze izbojaka i grančica, lezije i rakaste tvorevine na kori (Kirisits i sur. 2010). Simptomi odumiranja su također primijećeni na više od 90 % stabala u Turskoj na 490 ha nizinske kulture stare 100 godina, te na 100 ha mlade kulture (Akilli i sur. 2013b).

1.3 Uloga gljiva i gljivama sličnih organizama u odumiranju šumskog drveća

Odumiranje šuma je obično posljedica kumulativnog i sinergijskog djelovanja više biotičkih i abiotičkih čimbenika (Kozarac 1897, Kovačević 1928, Nenadić 1940, Dekanić 1972, Androić 1975), uključujući promjene klime i staništa, antropogeni utjecaj i štetne organizme (Mueller-Dombois 1986), pri čemu gljive i gljivama slični organizmi imaju važnu ulogu ne samo kao patogeni organizmi koji uzrokuju biljne bolesti (Carlile i Watkinson 1994), već i kao važne karike u kruženju tvari u prirodi i održavanju ravnoteže šumskih ekosustava. Gljive čine najveću živuću biomasu u organskim slojevima šumskog tla, sudjeluju u mobilizaciji, unosu i translokaciji nutrijenata (Steiner i sur. 2002) te mogu doprinijeti poboljšanju rasta i povećanju otpornosti biljaka na određene patogene (Saldajeno i sur. 2008).

1.3.1 Pojam gljivama sličnih organizama u ovome istraživanju

Gljivama slični organizmi u najširem smislu obuhvaćaju sve heterotrofne organizme koji stvaraju pokretljive zoospore te koji su kroz povijest smatrani gljivama, a za koje je danas na temelju određenih jedinstvenih karateristika poznato kako čine zasebne skupine, pa tako Deacon (2013) u gljivama slične organizme u širem smislu ubraja:

⇒ odjel *Oomycota* carstva *Straminipila* (*Stramenopila*),

⇒ stanične sluzave plijesni (sluznjače) (*Acrasiomycota* i *Dictyosteliomycota*),

⇒ plazmodijalne sluzave plijesni (*Myxomycota*),

⇒ plazmodioforide (*Plasmodiophoromycota*).

Navedena skupina organizama do danas nije jednoznačno određena niti smještena u sistematskoj podjeli živog svijeta, te se još uvijek vode polemike oko pripadnosti carstvu i njegova naziva, pa ih tako neki autori ubrajaju u carstvo *Chromista* (Hawksworth i sur. 1995), dok ih drugi smještaju u carstvo *Straminipila* (Dick 2001), koje se još često navodi i kao *Stramenopila* (Patterson i Sogin 1992). U literaturi se za gljivama slične organizme u užem smislu također mogu naći različiti nazivi na razini odjela: *Heterokonta* (Dick 2001), *Pseudofungi* (Cavalier-Smith i Chao 2006) ili *Oomycota* (Deacon 2013, Beakes i sur. 2014).

Novija istraživanja većinu gljivama sličnih organizama u najširem smislu svrstavaju u supercarstvo *Straminipila/Alveolata/Rhizaria* ili skraćeno SAR (Adl i sur. 2012, Marano i sur. 2017), unutar carstva *Straminipila*, koje se prema Anderson i Cavalier-Smith (2012) može izjednačiti s odjelom *Heterokonta*. Prema ovoj klasifikaciji carstvo *Straminipila* uključuje

jedan velik i iznimno važan odjel, *Oomycota*, te dva manja odjela, *Hyphochytridiomycota* i *Labyrinthulomycota* (Deacon 2013, Beakes i sur. 2014).

Za potrebe izrade ovog doktorskog rada će se u obzir uzimati nazivlje prema Adl i sur. (2012) te Marano i sur. (2017), a obuhvatiti će se samo uži pojam gljivama sličnih organizama koji se odnosi na odjel *Oomycota*, jer on uključuje ekonomski najvažnije vrste s iznimno važnim ulogama u mnogim okolišnim procesima. Pojedine od njih se smatraju nekim od najopasnijih biljnih patogena, kao što su vrste roda *Phytophthora* (uzročnici odumiranja šuma različitih vrsta drveća), *Pythium* (uzročnici polijeganja ponika u šumskim rasadnicima), *Peronospora* (pepelnice), *Albugo* (rđe) i dr. (Cooke i sur. 2000, Drenth i Sendall 2001), iako su to samo neki od brojnih rodova zastupljenih unutar odjela *Oomycota* (Tablica 2) (Beakes i sur. 2014).

Tablica 2. Sažet pregled klasifikacije unutar odjela *Oomycota* (Beakes i sur. 2014)

Odjel *Oomycota*	
Redovi incertae sedis*	*Eurychasmales, Haptoglossales, Olpidiopsidales* s.lat., *Haliphthorales*
Razred *Saprolegniomycetes*	**Redovi** *Atkinsiellales, Leptomitales* s.lat.**, *Saprolegniales*
Razred *Peronosporomycetes*	**Redovi** *Rhipidiales, Albuginales, Peronosporales* s.lat.
Red *Rhipidiales*	**Porodica** *Rhipidiaceae* (*Sapromyces* i dr.)
Red *Albuginales*	**Porodica** *Albuginaceae* (*Albugo, Pustula, Wilsonia*)
Red *Peronosporales* s.lat.	**Porodice** *Salisapiliaceae, Pythiaceae* s.lat., *Peronosporaceae* s.lat.
Salisapiliaceae	*Salisapilia*
Pythiaceae s.lat.	*Pythium* i dr.
Peronosporaceae s.lat.	*Phytopythium, Phytophthora, Peronospora, Bremia* i dr.

**odnosi se na takson ili grupu taksona čija je sveza s ostalima nepoznata*
***latinski sensu lato, odnosno u širem smislu*

Pripadnici odjela *Oomycota* su dugo smatrani gljivama te bili i ostali predmet istraživanja mikologa, iako su danas prepoznati kao zasebna skupina na temelju više značajki po kojima se od njih razlikuju (Tablica 3) (Rossman i Palm 2006). Ovi su organizmi razvili način života gotovo istovjetan gljivama, uključujući apikalan rast hifa te ulazak u biljne stanice pomoću enzima koji razgrađuju staničnu stijenku. Mnoge zajedničke morfološke i fiziološke značajke koje dijele s pravim gljivama (carstvo *Fungi*) su nastale konvergentnom evolucijom[1], primjerice tvorba micelija, unos hranjivih tvari apsorpcijom te mehanizmi infekcije, prvenstveno zahvaljujući horizontalnom prijenosu gena (nespolni prijenos između različitih vrsta) (Richards i sur. 2006, Meng i sur. 2009).

[1] Razvoj sličnih osobina i sličnih organa s istim funkcijama kod vrsta koje nisu međusobno srodne do kojih dolazi tijekom evolucije kao posljedica prilagođavanju sličnim uvjetima života.

Tablica 3. Zajednička i jedinstvena svojstva pripadnika carstva *Fungi* i odjela *Oomycota* (Rossman i Palm 2006)

Oomycota	**Zajednička svojstva**	***Fungi***
spolnim razmnožavanjem nastaju oospore nakon oplodnje oosfera anteridijima	- stvaranje micelija ili jednostaničnih tvorbi - ishrana apsorpcijom hranjivih tvari	spolnim razmnožavanjem ne nastaju oospore, već zigo-, asko- ili bazidiospore
vegetativni micelij diploidan		vegetativni micelij haploidan ili dikariotski
hife neseptirane		hife kod većine vrsta septirane
beta glukan i celuloza u staničnoj stijenci		hitin u staničnoj stijenci (rijetko celuloza)
heterokontni tip flagele, jedna bičasta i smještena posteriorno, dok je druga trepavičasta i smještena anteriorno		ukoliko je prisutna, flagela je posteriorna i bičasta
mitohondriji s tubularnim kristama		mitohondriji s plosnatim kristama

Gljivama slični organizmi su nastavili biti dio mikoloških istraživanja, pri čemu se definiraju kao eukariotski osmotrofi[2] koji asimilaciju hranjivih tvari vrše kroz staničnu stijenku (Dick 1997), a upravo je prilagodba na takav način ishrane rezultirala njihovom velikom sličnošću s pravim gljivama, što se može vidjeti i na primjeru slične morfologije bijelih rđa odjela *Oomycota* (*Albugo* spp.) i uredosorusa rđa carstva *Fungi*. U budućnosti će bolje razumijevanje evolucijskih odnosa ovih skupina organizama zasigurno doprinijeti razvoju strategija kontrole bolesti koje uzrokuju (Rossman i Palm 2006).

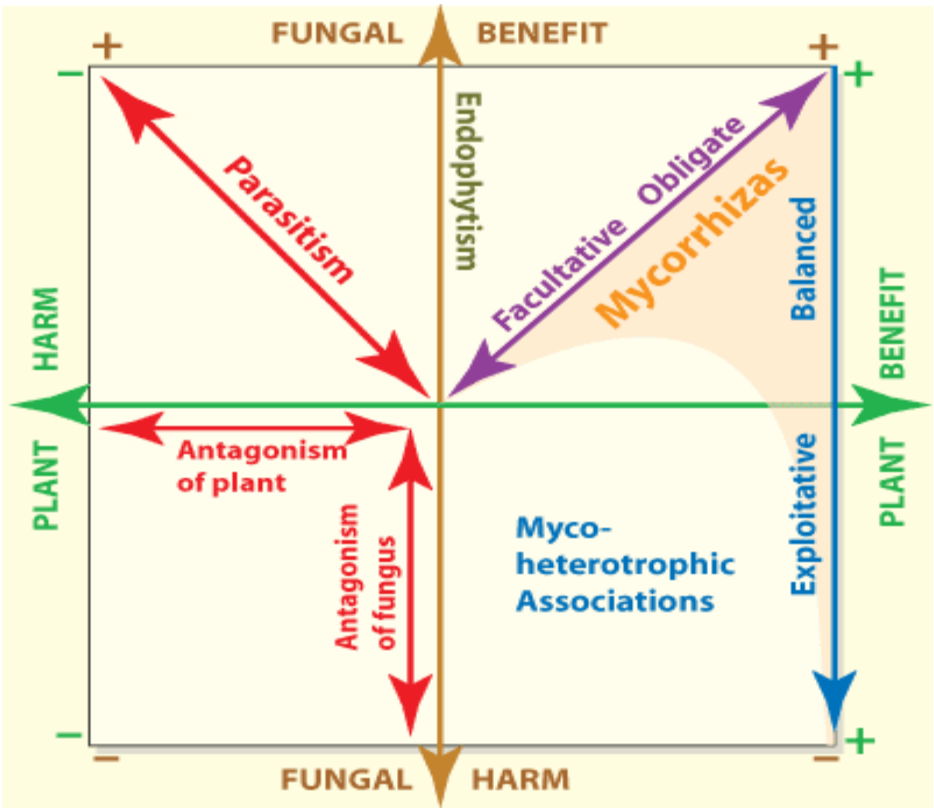
1.3.2 Načini života i ishrane gljiva i gljivama sličnih organizama i pripadajuća uloga u šumskim ekosustavima

S obzirom na njihov odnos prema biljkama, gljive i GSO se kategoriziraju kao saprotrofi, paraziti (patogeni), endofiti, epifiti i mikorizne gljive (Porras-Alfaro i Bayman 2011). Kako se prema drugim autorima epifiti smatraju polifiletskom skupinom organizama koja obitava na površini živih biljnih organa, a koji mogu ispoljavati saprotrofski i parazitski način života, u ovome se istraživanju neće razmatrati kao zasebna kategorija načina života i ishrane (Gilbert i Reynolds 2002, 2005).

Prema najširoj podjeli, saprotrofima se smatraju oni organizmi koji energiju odnosno potrebne nutrijente uzimaju iz mrtvog tkiva, dok se oni koji se hranjivima snabdijevaju iz živih tkiva

[2] Heterotrofni organizmi koji se nutrijentima snabdijevaju apsorbirajući otopljene organske tvari iz okoline putem osmoze.

kategoriziraju kao parazitski, mutualistički ili komenzalistički simbionti (Lewis 1985, Carlile i Watkinson 1994). Pod pojmom simbioze se u najširem smislu podrazumijeva suživot organizama različitih vrsta (De Bary 1879), pri čemu su mutualističke gljive i GSO oni koji biljkama domaćinima pružaju neke koristi, dok su parazitske gljive i GSO oni koji imaju negativan utjecaj na biljku domaćina. U komenzalizmu kao tipu simbioze samo jedan organizam ima korist od takvog odnosa dok na drugom organizmu nisu vidljivi ni pozitivni ni negativni efekti (Redman i sur. 2001). Različite odnose gljiva i biljaka s njihovim utjecajem na oba organizma je grafički prikazao Brundrett (2004) na dijagramu podijeljenom u četiri kvadranta, gdje vodoravna os gledano slijeva na desno predstavlja pomak od štetnih do korisnih posljedica za biljku, dok okomita os predstavlja to isto za gljivu promatrano od dna prema vrhu (Slika 2).



Slika 2. Dijagram mogućih odnosa između gljiva i biljaka te njihovih posljedica po oba organizma (Brundrett 2004)

Gljive i GSO saprotrofi su ključni regulatori kruženja tvari u kopnenim ekosustavima, zahvaljujući razvijenim mrežama hifa u sloju tla i listinca kroz koje se lako distribuiraju hranjive tvari (Crowther i sur. 2012). Saprotrofi proizvode niz enzima koji im omogućuju razgradnju složenih polimera tako da, osim što imaju važnu ulogu u razgradnji celuloze koja je najzastupljeniji prirodni polimer na Zemlji čineći 40 % biljnih staničnih stijenki, imaju mogućnost razgradnje najsloženijih lignificiranih materijala poput drva (Deacon 2013).

Smatra se kako su saprotrofi fizički odvojeni i funkcionalno neovisni u odnosu na živa stabla jer razgrađuju mrtvu organsku tvar (Cooke i Rayner 1984), međutim poznato je kako saprotrofni i biotrofni način života ne moraju nužno isključivati jedan drugog upućujući na potencijalnu mogućnost pojedinih gljiva i GSO da prakticiraju oba načina u različitim okolnostima (Cooke i Whipps 1993). Primjerice, vrste roda *Armillaria* (Fr.) Staude mogu formirati orhidejni tip mikorize te živjeti kao saprotrofi ili kao patogeni na stablima (Smith i Read 1997). Vrsta *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. također u svom životnom ciklusu prelazi iz parazitskog u saprotrofni način života, inficirajući dubeća stabla do smrti, nakon čega nastavlja kolonizirati i razgrađivati mrtvu organsku tvar (Olson i sur. 2012). Vasiliauskas i sur. (2007) u svom istraživanju iznose dokaze kojima potvrđuju sposobnost saprotrofnih gljiva razgrađivača drva da žive u sloju rizosfere i koloniziraju zdravo sitno korijenje sadnica četinjača u terenskim uvjetima. U navedenom istraživanju nisu zabilježene negativne posljedice po biljke, za razliku od nekih sličnih prijašnjih istraživanja gdje je kolonizacija korijena rezultirala smanjenim rastom (Riffle 1973) ili smrću biljaka (Yamada i sur. 2001). U literaturi se gljive i GSO koje mogu prelaziti iz saprotrofskog u parazitski način života te obrnuto često nazivaju i fakultativnim parazitima te fakultativnim saprotrofima (Webster i Weber 2007).

Velik broj gljiva i GSO se prilagodio parazitskom načinu života na biljkama, pri čemu su često specijalizirani za jednu vrstu domaćina ili čak jedan tip biljnog organa. Razlikuju se biotrofni paraziti koji se hrane živim stanicama ne uzrokujući odmah njihovu smrt te nekrotrofni koji kao dio procesa ishrane usmrćuju stanice i tkiva domaćina, primjerice proizvodeći toksine ili enzime za razgradnju (Deacon 2013). Parazitske gljive i GSO na biljkama mogu uzrokovati različite posljedice u rasponu od smanjenja rasta i/ili plodnosti pa sve do smrti (Redman i sur. 2001).

Dok pojam paraziti obuhvaća sve gljive i GSO koje u suživotu sa biljkama ostvaruju korist pritom uzrokujući neki vid negativnih posljedica po domaćina, paraziti koji imaju značajne štetne učinke na domaćina, odnosno uzročnici su bolesti, se nazivaju patogenima (Carlile i Watkinson 1994). Patogene gljive i GSO mogu imati veliku ulogu u održavanju bioraznolikosti šuma te prostornoj distribuciji vrsta drveća (Packer i Clay 2000, Reinhart i sur. 2003), jer mogu utjecati na uspjeh određene vrste omogućujući joj suživot s drugim vrstama (Westover i Bever 2001), ili mogu uzrokovati gubitak vrste smanjujući njenu sposobnost konkurencije te omogućujući njenu zamjenu tijekom prirodne sukcesije (Van der Putten i Peters 1997). Ove odnose je često teško definirati, jer interakcije među patogenima i drugim

organizmima te prelazak na drugačiji način života i ishrane ovise o životnoj fazi, domaćinu te okolišnim čimbenicima (Smith i Read 1997). Carlile i Watkinson (1994) tako navode da nekrotrofni paraziti, odnosno patogeni mogu imati biotrofnu fazu te također prijeći i na saprotrofni način života nakon potpune smrti domaćina, dok oni poznati kao biotrofi mogu s biljkom domaćinom pod određenim uvjetima razviti mutualistički odnos.

Smatra se kako gotovo sve biljne vrste u prirodnim ekosustavima razvijaju simbiotske odnose s mikoriznim gljivama i/ili endofitima (Petrini 1986), pri čemu mikorizne gljive koloniziraju korijen te rastu u rizosferi, dok se endofiti u potpunosti nalaze unutar biljnih tkiva uključujući korijen, deblo i list, izvan kojih rastu samo u slučaju sporulacije nakon starenja tkiva domaćina (Sherwood i Carroll 1974, Carroll 1988, Stone i sur. 2004).

Endofiti, definirani kao one vrste koje obitavaju unutar živih biljnih tkiva bez da uzrokuju vidljive simptome bolesti u određenom vremenu, su izolirani iz svakog organa gotovo svake biljne vrste podvrgnute istraživanju (Stone i sur. 2000). Endofiti se obično razmatraju zasebno od epifita, jer dosadašnji dostupni dokazi upućuju na vrlo malo ili čak nimalo sličnosti između zajednica gljiva koje obitavaju unutar biljnih organa te na njihovoj površini (Girivasan i Suryanarayanan 2004, Santamaría i Bayman 2005). Endofiti mogu biti gljive ili GSO (Sinclair i Cerkauskas 1996) specijalizirani za zauzimanje bilo koje ekološke niše unutar biljke domaćina ili oni specijalizirani za pojedine biljne organe, mogu rasti intrastanično i interstanično, zauzimati samo nadzemne ili podzemne organe, rasti samo kao endofiti ili također i kao epifiti, te biti prilagođeni samo određenom domaćinu ili ne pokazivati specijalizaciju s obzirom na domaćina (Schulz i Boyle 2005).

Pojam endofita je bio predmetom brojnih rasprava (Wilson i Faeth 2001), jer se ne odnosi samo na prave endofite, već i na latentne patogene (Carroll 1988, Saikkonen i sur. 2004). Sieber (2007) navodi kako endofiti drvenastog bilja mogu biti potencijalni patogeni koji postaju aktivni uslijed promjene okolišnih uvjeta, koji mogu postati pogodni za samu gljivu ili nepovoljni za biljku. Nadalje navodi kako se neki endofiti mogu smatrati mutualističkim simbiontima jer djeluju antagonistički na herbivore i druge štetne i patogene organizme, ili čak mogu ispoljavati oba načina života: mutualizam pod jednim uvjetima te parazitizam pod drugim. Prisutnost endofita u tkivu domaćina prema nekim istraživanjima može dovesti do povećane otpornosti na bolesti, poboljšanog rasta domaćina te zaštite od štetnih insekata zahvaljujući sintezi sekundarnih metabolita (Miller i sur. 2002, Selosse i sur. 2004). S druge strane, istraživanja ukazuju kako neke poznate patogene gljive na šumskom drveću imaju latentnu fazu u biljkama kao endofiti te bolest uzrokuju tek nakon fizičkog ili mehaničkog

oštećenja domaćina ili njegova općenitog fiziološkog slabljenja uslijed stresa (Hendry i sur. 2002, Slippers i Wingfield 2007), kao i da endofiti koji su prethodno bili u mutualističkom odnosu naspram domaćina mogu postati patogeni kada je biljka pod stresom (Kuldau i Yates 2000, Jumpponen 2001). I drugi autori opisuju endofite kao skupine organizama koji mogu biti latentni patogeni, mutualistički simbionti ili organizmi bez poznatog i vidljivog pozitivnog ili negativnog učinka na biljku (Freeman i Rodriguez 1993, Sinclair i Cerkauskas 1996).

Brundrett (2004) opisuje mikorizu kao simbiotski odnos esencijalan za jednog ili oba partnera, između gljiva specijaliziranih za život u tlu i biljnom tkivu te korijena živih biljaka (ili nekog drugog organa u dodiru s tlom), čija je primarna uloga prijenos nutrijenata, a uključuje blizak kontakt organizama koji proizlazi iz njihova sinkroniziranog razvoja. Većina istraživanja upućuje na korisne aspekte mikorize za biljke, navodeći povećanje opskrbe hranjivima i vodom zahvaljujući pristupu većem volumenu tla putem hifa i pretvorbi složenih nutrijenata u jednostavne spojeve, zaštitu od parazitskih gljiva i nematoda, potiskivanje drugih vrsta konkurentskih biljaka, smanjenje konkurencije između biljaka iste i različitih vrsta alokacijom vode i hranjiva na potrebna mjesta te ostale koristi koje proizlaze iz nabrojanih (Brundrett i Abbott 2002, Brundrett i Cairney 2002). Vrste roda *Fraxinus* stvaraju arbuskularni tip mikorize koji u širem smislu spada u endomikorizu (Lamar i Davey 1988, Lang i sur. 2011, Kubisch i sur. 2015), a karakterizira ga ulazak hifa u stanice korijena gdje stvaraju visoko razgranate strukture, takozvane arbuskule (Balestrini i sur. 2015).

Schulz i Boyle (2005) zaključuju kako u odnosima gljiva i GSO te biljaka nema neutralnih interakcija, već ishod odnosa ovisi o ravnoteži antagonizama, odnosno smatraju kako uvijek postoji određeni, makar i najmanji stupanj virulentnosti gljive ili sličnog organizma koji im omogućava kolonizaciju biljnog tkiva te pristup hranjivima i zaklonu, a s druge strane kako će biljka uvijek pokrenuti određenu obrambenu reakciju s ciljem ograničavanja njihova širenja u tkivu. Ovakav mutualistički antagonizam može trajati dulji ili kraći vremenski period, primjerice do stvaranja hlamidospora ili nekih drugih mirujućih struktura gljive ili GSO u biljnom tkivu. Promjenjivost prirode odnosa gljive ili sličnog organizama te biljke proizlazi iz promjenjivosti svake indvidue, koja se prilagođava trenutačnom statusu drugog organizma i postojećim uvjetima okoliša na koje i sama može različito reagirati. Slično zaključuju i Smith i Read (1997), navodeći kako u simbiotskim odnosima gljiva i sličnih organizama te biljaka uvijek postoji konflikt interesa, te Redman i sur. (2001) koji objašnjavaju kako način života gljivičnog simbionta te priroda simbiotskog odnosa ovise o biljci, odnosno o sposobnosti

biljke da reagira na učinke gljive ili o razlikama u ekspresiji gena gljive kao odgovoru na reakcije biljke.

1.3.3 Uloga patogenih gljivama sličnih organizama roda *Phytophthora*

Gljivama slični organizmi imaju važnu ulogu kao saprotrofi u kruženju tvari u vodenim i kopnenim ekosustavima te ih Sinclair i Cerkauskas (1996) navode i kao moguće endofite, ali su prvenstveno poznati i istraživani kao patogeni biljaka jer uzrokuju neke od najdestruktivnijih biljnih bolesti. Red *Peronosporales*, koji je poznat po nekim od najopasnijih biljnih patogena, također uključuje i saprotrofne vrste, iako ograničene na rodove *Halophytophthora* i *Salisapilia* te određene vrste rodova *Phytopythium* i *Phytophthora*, široko rasprostranjene u kopnenim i vodenim ekosustavima (Marano i sur. 2016).

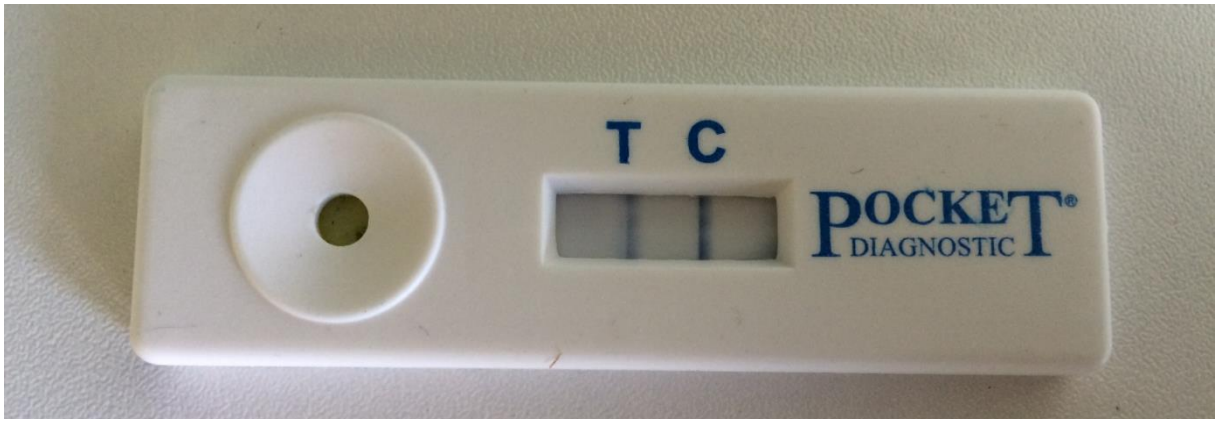
Gljivama slični organizmi roda *Phytophthora* sudjeluju u odumiranju nekih od najvažnijih vrsta šumskog drveća u Europi (Jung i sur. 2013), te se njihova prisutnost u tlu šumskih ekosustava smatra važnim biotskim čimbenikom odgovornim za smrtnost stabala (Jankowiak i sur. 2014). Unos i širenje alohtonih vrsta u prirodne šumske ekosustave iz rasadnika zahvaljujući rastu međunarodne trgovine biljem se smatra rastućom prijetnjom za šumsko drveće jer mogu uzrokovati značajne štete (Brasier i Jung 2004). Većina vrsta uzrokuje bolesti korijena, ali neke mogu, posebice na drveću, uzrokovati rak debla ili inficirati lišće, zbog čega se raspoznaju tri osnovne skupine s obzirom na tip patogeneze: 1) vrste vodenih ekosustava koje su oportunistički patogeni; 2) patogeni lišća te 3) patogeni korijena i uzročnici raka prisutni u tlu (Hansen 2015).

Različite vrste roda *Phytophthora*, od kojih je za njih nekoliko potvrđeno kako su unesene iz izvaneuropskih zemalja, sudjeluju u odumiranju šumskog drveća na većim površinama diljem kontinenta. Tako se nekoliko različitih vrsta povezuje s povećanim odumiranjem listopadnih vrsta hrastova, *Phytophthora lateralis* Tucker & Milbrath smatra odgovornom za sušenje Lawsonovog pačempresa (*Chamaecyparis lawsoniana* (A. Murray) Parl.) u Francuskoj, Nizozemskoj i Velikoj Britaniji, *P. ramorum* Werres, De Cock & Man in 't Veld za sušenje japanskog ariša (*Larix kaempferi* (Lamb.) Carrière) u Velikoj Britaniji, *P. cinnamomi* Rands za odumiranje hrasta plutnjaka (*Quercus suber* L.), hrasta crnike (*Quercus ilex* L.) i pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.) u južnoj i zapadnoj Europi, *P. cambivora* (Petri) Buisman i druge vrste za odumiranje pitomog kestena u jugoistočnoj Europi, te više različitih vrsta za odumiranje obične bukve (*Fagus sylvatica* L.) diljem Europe (Brasier i Jung 2004, Jung i sur. 2013, Hansen 2015).

U istraživanjima vrsta roda *Phytophthora* su često u većem broju prisutne i vrste srodnih rodova *Pythium* i *Phytopythium*, zbog čega neki autori nagađaju kako bi također mogle imati određenu ulogu u odumiranju (Akilli i sur. 2013a, Jankowiak i sur. 2015). Vrste roda *Pythium* poznate su kao kozmopolitske vrste sveprisutne u tlu, od kojih su nekolicina potvrđene kao biljni patogeni koji mogu uzrokovati polijeganje ponika, ali i trulež plodova, sjemena, korijena i debla šumskih vrsta drveća prvenstveno u rasadnicima (Campbell i sur. 1972, Jankowiak i sur. 2015). Vrste roda *Pythium* koje su pripadale kladi K (LéVesque i de Cock 2004) su u novije vrijeme zbog značajki koje dijele s vrstama roda *Phytophthora* svrstane u novi rod *Phytopythium* (Bala i sur. 2010, de Cock i sur. 2015), a autori navode kako i u ostalim kladama (A-J) može doći do sličnih promjena, iako preporučuju korištenje dosadašnje podjele dok se ne nađu odgovarajući filogenetski biljezi (de Cock i sur. 2015).

U Republici Hrvatskoj je dosad pronađeno nekoliko vrsta roda *Phytophthora* na šumskom drveću sa simptomima odumiranja. *Phytophthora cambivora* je prvi puta primijećena 2008. godine na običnoj bukvi (*Fagus sylvatica* L.) na području Bjelovara (Bakran i sur. 2009), a 2011. je potvrđen pozitivan nalaz ne samo na bukvi već i na euroameričkim topolama (*Populus* x *euroamericana*) u kulturama na području Osijeka (Pernek i sur. 2011). U istom je istraživanju na topolama na kojima su prvi simptomi utvrđeni još 2005. godine, pronađena i *Phytophthora gonapodyides* (H.E. Petersen) Buisman. Na crnoj johi (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) je tijekom 2012. godine na tri lokacije u Koprivničko-križevačkoj i Bjelovarsko-bilogorskoj županiji zabilježena *Phytophthora alni* Brasier & S.A. Kirk (Tomić i Ivić 2013), a postoje i pretpostavke o prisutnosti vrste *Phytophthora quercina* T. Jung na hrastovima, iako bez opisanih detalja i laboratorijske potvrde nalaza (Županić 2004).

Tijekom 2016. godine su na uzorcima tla iz odumirućih sastojina poljskoga jasena na području Posavine provedena preliminarna testiranja pomoću terenskih dijagnostičkih testova (eng. *Pocket diagnostic test*, Abingdon Health Ltd., UK) za dokazivanje prisutnosti vrsta roda *Phytophthora* u biljnom tkivu. Od 15 korištenih dijagnostičkih testova, njih 12 je pokazalo pozitivan rezultat (Slika 3) za prisutnost vrsta roda *Phytophthora* u listovima koji su postavljeni kao mamci na površinu vode iznad potopljenih uzoraka tla (Hegol 2016). Međutim, kako su navedeni rezultati općenitog karaktera te ne pružaju informacije o samim vrstama, za saznanja o potencijalnoj ulozi ovih organizama u odumiranju poljskoga jasena u Republici Hrvatskoj je potrebno provesti dodatna istraživanja.



Slika 3. Terenski dijagnostički test koji pokazuje pozitivan rezultat na prisustvo vrsta roda *Phytophthora* u ispitivanom tkivu

1.3.4 Napredak u istraživanju gljiva i gljivama sličnih organizama primjenom molekularnih metoda

Iako gljive čine iznimno važnu skupinu organizama, do danas ih je identificirano svega 100.000 (Kirk i sur. 2008) od procijenjenog broja vrsta od 1,5 milijuna (Hawksworth 1991, Hawksworth 2001), što ih čini jednim od najslabije istraženih izvora bioraznolikosti na Zemlji. Iako postoje istraživanja koja ovu brojku smatraju precijenjenom navodeći kako je broj vrsta bliži 700.000 (Schmit i Mueller 2007), dok drugi autori procjenjuju kako bi broj vrsta mogao iznositi čak 5,1 milijuna (O'Brien i sur. 2005), svi se slažu oko činjenice kako 100.000 poznatih vrsta predstavlja samo malen udio u njihovoj ukupnoj bioraznolikosti (Hibbett i Glotzer 2011). S obzirom na sadašnju stopu otkrivanja oko 1.200 novih vrsta svake godine te postojeće procjene njihove raznolikosti, biti će potrebno između 1.170 do 2.840 godina kako bi se sve opisale (Blackwell 2011).

Osim poteškoća u određivanju broja vrsta gljiva, vrlo je teško razgraničiti gljive kao skupinu od ostalih eukariotskih organizama, stoga se stoljeće unazad vode rasprave o uključivanju ili isključivanju pojedinih grupa iz carstva gljiva, posebice u novije vrijeme kada se suprotstavljaju taksonomisti koji podržavaju filogenetsku definiciju temeljenu isključivo na sekvencama odabranih segmenata DNA te oni koji zauzimaju biološki pristup smatrajući gljivama sve organizme koji dijele sve ili mnoge ključne ekološke i fiziološke karakteristike (Webster i Weber 2007). Tako su filogenetska istraživanja pokazala da su protisti skupine *Nucleariidia* (amebe s filamentoznim pseudopodima) sestrinska grupa carstva gljiva (Medina i sur. 2003), dok su organizmi s heterokontnim flagelama koji ne vrše fotosintezu te sluzave plijesni izdvojeni iz carstva (Alexopoulos i sur. 1996). Osim navedenog, do poteškoća u proučavanju ovih organizama mogu dovesti i nedosljednosti u imenovanju skupina unutar

carstva, unatoč tome što je danas postignut širi sporazum o njihovoj klasifikaciji, pa se tako i za taksone više razine koriste različita imena, primjerice određeni autori razred *Basidiomycetes* nazivaju *Hymenomycetes,* te razred *Ascomycetes* izjednačuju s pododjelom *Pezizomycotina* (Hibbett i sur. 2007).

Navedene poteškoće u istraživanju gljiva i gljivama sličnih organizama proizlaze iz činjenice da su većina vrsta mikroorganizmi, te da i vrste poznate kao makroskopske veći dio svog života provedu u obliku micelija skrivenog u tlu ili nekom drugom supstratu. Identifikaciju dodatno otežavaju postojanje velikog broja morfološki sličnih ili čak identičnih vrsta, varijabilnost značajki unutar vrste s obzirom na stanišne uvjete, nemogućnost izolacije i uzgoja čistih kultura micelija i razvoja plodnih struktura brojnih vrsta u laboratorijskim uvjetima te dimorfni i pleomorfni životni ciklusi vrsta koji mogu uključivati prelaske iz jednostaničnih oblika u formu micelija. Sve navedeno čini gljive i GSO skupinama u kojima su za pronalazak i identifikaciju vrste nužne analize njihove genomske DNA, odnosno primjena molekularnih metoda (Seifert 2009).

Molekularna revolucija u identifikaciji i sistematici gljiva i sličnih organizama je počela ranih devedesetih godina prošlog stoljeća analizom ribosomskih RNA gena umnoženih u lančanoj reakciji polimerazom (White i sur. 1990) te osnivanjem javne mrežno dostupne baze gena NCBI GenBank u koju je odmah pohranjeno približno 6.000 sekvenci gljiva (Begerow i sur. 2010). Od tog su perioda molekularne informacije postale nezamjenjiv alat za brzu delimitaciju i identifikaciju taksona te određivanje taksonomskog položaja i međusobnih sveza između organizama.

Kao standardni barkod (crtični kod) za identifikaciju gljiva je usvojena ITS regija unutar ribosomske RNA (18S rRNA – ITS1 – 5.8 rRNA – ITS2 – 28S rRNA), za koju se smatra da zadovoljava potrebe većine istraživanja gljiva, a navodi se i njena primjenjivost na druge organizme poput *Clorophyta* i biljaka te vrsta odjela *Oomycota* (Schoch i sur. 2012). Primjena molekularnih metoda korištenjem ITS regije za identifikaciju otvara nove mogućnosti istraživanja bioraznolikosti gljiva i njima sličnih organizama, primjerice u tlu i drugim slabije istraženim supstratima (O'Brien i sur. 2005) te može značajno poboljšati praćenje prostorne i vremenske distribucije i migracije uzročnika biljnih bolesti i tako olakšati njihovo suzbijanje. U odnosu na prijašnje morfološke, anatomske, ultrastrukturalne i kemijske protokole koji su se primjenjivali u identifikaciji, molekularne metode su objektivne, brze i jednostavne (Brasier 1996, Crous i sur. 2007).

1.4 Pregled dosadašnjih istraživanja uloge gljiva i gljivama sličnih organizama u odumiranju jasena (*Fraxinus* spp.)

Kao primarni uzročnik odumiranja običnog jasena (*Fraxinus excelsior* L.) diljem Europe koje je prvi puta zabilježeno u Poljskoj devedesetih godina prošlog stoljeća je potvrđena patogena gljiva *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya (Baral i sur. 2014), prvotno definirana u anamorfnom obliku kao *Chalara fraxinea* T. Kowalski (Kowalski 2006). U većini europskih država je patogen utvrđen na običnom jasenu, dok je u Njemačkoj (Schumacher i sur. 2007), Češkoj (Jankovsky i Holdenrieder 2009), Sloveniji (Hauptman i sur. 2012), Austriji i Mađarskoj (Kirisits i sur. 2010) te Italiji (Montecchio, usmeno priopćenje) potvrđen i na poljskom jasenu s prisutnim simptomima odumiranja u rasadnicima, kulturama i prirodnim sastojinama.

U Republici Hrvatskoj je navedeni patogen prvi puta zabilježen 2009. godine na običnom jasenu u Gorskom kotaru (Barić i Diminić 2010), a kasnije je utvrđen i na drugim lokacijama u prirodnim sastojinama u kojima pridolazi obični jasen. Na poljskom jasenu je prvi put izoliran 2011. godine u područjima dodira areala običnog i poljskog jasena u Republici Hrvatskoj (Pisarovinski lugovi, Jastrebarski lugovi i Donje Međimurje) te 2015. godine u Posavini gdje se nalaze najveći kompleksi poljskoga jasena u Republici Hrvatskoj (Diminić 2015, Milotić i sur. 2016). Iako strani autori gljivu *Hymenoscyphus fraxineus* smatraju jednim od primarnih uzročnika odumiranja običnog i poljskog jasena u Europi (Bakys i sur. 2009a, Kräutler i Kirisits 2012, Gross i sur. 2014), navedeni patogen još uvijek nije potvrđen kao primarni uzročnik odumiranja poljskoga jasena u nizinskim šumama Republike Hrvatske.

Kako u odumiranju šumskih vrsta drveća, odnosno šuma općenito, sudjeluje više različitih abiotičkih i biotičkih čimbenika, često se provode kompleksna istraživanja zajednica gljiva i gljivama sličnih organizama na simptomatičnim i vizualno zdravim stablima s ciljem utvrđivanja njihove uloge u procesu. Gotovo sva istraživanja tog karaktera na vrstama roda *Fraxinus* su izvršena na običnom jasenu. Tako Griffith i Boddy (1988) navode kako se u odumirućim i odumrlim granama običnog jasena mogu ovisno o stadiju odumiranja razlikovati gljive primarni kolonizatori koje su prisutne u kori zdravih grana a drvo inficiraju nakon početka procesa odumiranja te sekundarni kolonizatori, vrste koje aktivnim ili pasivnim putem postepeno zamjenjuju primarne.

Przybył (2002b) na uzorcima korijena mladih stabala običnog jasena s prisutnom truleži sitnog korijenja istražuje pridolazeće zajednice gljiva i gljivama sličnih organizama kako bi kasnije umjetnom inokulacijom u testovima patogenosti mogla odrediti ulogu pojedinih vrsta

u uzrokovanju truleži. Najveći broj različitih vrsta otkriva na korijenju najmlađih, jednogodišnjih stabala, te utvrđuje kako neke od najčešće izoliranih vrsta (*Fusarium oxysporum* E.F. Sm. & Swingle, *Ilyonectria destructans* (Zinssm.) Rossman, L. Lombard & Crous, *Fusarium solani* (Mart.) Sacc.) mogu uzrokovati smeđe diskoloracije ili nekroze na inokuliranim sadnicama. Iz korijena također dobiva jedan izolat vrste roda *Phytophthora* ali ne provodi daljnja ispitivanja patogenosti. Ista autorica istražuje vrste gljiva koje pridolaze na izbojcima običnog jasena sa simptomima tamnosmeđih nekrotičnih lezija na kori te smeđih diskoloracija i venuća listova kako bi utvrdila njihovu ulogu u uzrokovanju navedenih simptoma (Przybył 2002a). Za vrstu *Botryosphaeria stevensii* Shoemaker navodi da ima ulogu u formiranju nekroza kore na deblu jer opisane simptome uzrokuje na inokuliranim sadnicama, dok vrsta *Fusarium solani* uzrokuje smeđu diskoloraciju tkiva, ali jedva zamjetnih razmjera (1 mm oko mjesta inokulacije).

Pukacki i Przybył (2005) istražuju vrste gljiva koje pridolaze na nekrotiziranim pupovima te nekrozama prisutnim na deblu običnog jasena nakon stresa prouzrokovanog mrazom te općenito niskim temperaturama, navodeći kako ovi abiotski čimbenici stvaraju predispoziciju za pridolazak nekih vrsta gljiva koje potom sudjeluju u procesu odumiranja. Na oba biljna organa najčešće izoliraju sljedeće vrste: *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., *Gibberella baccata* (Wallr.) Sacc. te *Phomopsis scobina* Höhn.

Lygis i sur. (2005) uspoređuju vrste gljiva koje pridolaze na deblima stabala običnog jasena različitog zdravstvenog stanja procijenjenog na temelju osutosti krošnje u sastojinama koje pokazuju simptome odumiranja kako bi otkrili potencijalne biljne patogene. Na većini stabala svih zdravstvenih kategorija otkrivaju prisutnost vrste *Armillaria cepistipes* Velen. koja se smatra patogenom slabosti te pretpostavljaju kako zasigurno doprinosi odumiranju te ubrzava proces u istraživanim sastojinama. Na korijenju izoliraju i druge vrste potencijalnih patogena jasena (*Boeremia exigua* (Desm.) Aveskamp, Gruyter & Verkley, *Botryosphaeria stevensii*, *Fusarium solani*, *Ilyonectria destructans*), iako u manjoj mjeri te bez vidljive povezanosti sa zdravstvenim stanjem stabala. Također ukazuju na različitost zajednica gljiva između zdravih, odumirućih i mrtvih stabala, koja iako se čini prirodnom, u prijašnjim istraživanjima nije zabilježena.

Bakys i sur. (2006) istražuju vrste gljiva na oštećenom korijenju stabala običnog jasena u različitim fazama odumiranja te na izbojcima koji pokazuju simptome različitog intenziteta. Utvrđuju kako postoji pozitivna korelacija između stupnja odumiranja stabala i oštećenosti korijenovog sustava te kako je na korijenju najzastupljenija *Armillaria* sp. pritom je ne

smatrajući primarnim uzročnikom odumiranja. Na izbojcima najčešće izoliraju sljedeće vrste: *Alternaria alternata*, *Fusarium* spp. te *Epicoccum nigrum* Link.

Nastavno na prethodna istraživanja, Bakys i sur. (2009b) nastoje razjasniti ulogu gljiva kao biotskih čimbenika koji utječu na odumiranje običnog jasena istražujući njihove zajednice koje pridolaze na zdravim te simptomatičnim izbojcima s različitim stupnjevima razvijenih nekroza. Pritom ne utvrđuju značajne razlike u zajednicama prisutnih vrsta između izbojaka različitih kategorija simptoma ali navode kako određene vrste u testovima patogenosti uzrokuju pojavu nekroza kore i kambija na sadnicama običnog jasena (*Alternaria alternata, Epicoccum nigrum, Hymenoscyphus fraxineus* i *Phomopsis* sp.), iako je većina inokuliranih sadnica ostala vizualno zdrava, dok s druge strane za neke poznate patogene vrste poput *Gibberella avenacea* R.J. Cook, *Botryosphaeria stevensii, Phoma* spp. te *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel izvještavaju kako nisu uzrokovale nastanak nekroza na mladim jasenovim biljkama.

U istraživanju uloge vrste *Hymenoscyphus fraxineus* u odumiranju običnog jasena provedenom iste godine (Bakys i sur. 2009a), autori dio istraživanja posvećuju i identifikaciji zajednica gljiva koje nastanjuju lišće i izbojke s različitim kategorijama simptoma te utvrđivanju prisutnosti patogenih gljivama sličnih organizama roda *Phytophthora* u simptomatičnom biljnom tkivu. Direktnim molekularnim analizama biljnog tkiva bez prethodne izolacije prisutnih vrsta ne utvrđuju prisutnost vrsta roda *Phytophthora*, a u velikoj mjeri pronalaze vrste *Cryptococcus foliicola* Q.M. Wang & F.Y. Bai, *Hymenoscyphus fraxineus*, *Didymella molleriana* (G. Winter) Q. Chen & L. Cai, *Boeremia exigua* i *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries. Autori navode kako se, iako se sve nabrojane vrste osim *Hymenoscyphus fraxineus* smatraju raširenim saprotrofima i/ili endofitima, njihov doprinos odumiranju do određene mjere ne može u potpunosti isključiti.

Osim na nadzemnim biljnim organima, Bakys i sur. (2011) u odumirućim sastojinama običnog jasena nastoje identificirati prisutne vrste gljiva na korijenovom sustavu stabala različitog zdravstvenog stanja, odnosno osutosti krošnje te odrediti njihovu ulogu u odumiranju. Kao i u istraživanju provedenom 2006. godine, utvrđuju pozitivnu korelaciju između stupnja oštećenosti krošnje i količine odumrlog tkiva u korijenovom sustavu, pritom identificirajući vrstu *Armillaia cepistipes* kao najčešće prisutnu te kao primarnog uzročnika truleži i sekundarnog čimbenika u procesu odumiranja. Od ostalih bazidiomiceta pronalaze vrste rodova *Coprinus, Phanerochaete* i *Pholiota*, a od drugih skupina gljiva najčešće izoliraju vrste *Cylindrocarpon* sp., *Pseudeurotium bakeri* C. Booth, *Ilyonectria radicicola*

(Gerlach & L. Nilsson) P. Chaverri & Salgado, *Scytalidium lignicola* Pesante, dvije vrste roda *Xylaria* te plijesni rodova *Penicillium* i *Trichoderma*, pritom ne nudeći objašnjenje za njihovu ulogu u odumiranju.

Osim u Europi, slična su istraživanja na običnom jasenu provedena i na Novom Zelandu (Chen 2012) kako bi se identificirale zajednice gljiva koje se nalaze u kori, drvu i pupovima zdravih stabala s ciljem utvrđivanja prisutnosti patogenih vrsta te vrsta unešenih zajedno s biljnim materijalom s obzirom da obični jasen nije autohtona vrsta već se na Novi Zeland uvozi. Određeni broj vrsta izoliranih gljiva je jednak onima nađenim u europskim istraživanjima, a neke od njih autor navodi i kao potencijalne patogene običnog jasena: *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds, *Epicoccum nigrum*, *Fusarium lateritium*, *Boeremia exigua* i *Venturia fraxini* Aderh., koji bi simptome mogli uzrokovati ukoliko dođe do pogoršanja uvjeta za biljku.

U istočnoj Ukrajini su vršena istraživanja vrsta gljiva koje pridolaze u simptomatičnim i vizualno zdravim izbojcima te lisnim peteljkama običnog jasena kako bi se usporedbom nađenih zajednica otkrili potencijalni uzročnici nastanka oštećenja (Davydenko i sur. 2013). Patogena gljiva *Hymenoscyphus fraxineus* je rjeđe izolirana iz simptomatičnih tkiva, a brojnošću su je nadmašile vrste *Epicoccum nigrum*, *Venturia fraxini*, *Colletotrichum truncatum*, *Aureobasidium pullulans* (de Bary & Löwenthal) G. Arnaud, *Alternaria alternata*, *Alternaria* sp. i *Lophiostoma corticola* (Fuckel) E.C.Y. Liew, Aptroot & K.D. Hyde. Autori navode kako većina pronađenih vrsta pripada saprotrofima i patogenima te kako postoji veza između vrsta gljiva koje se javljaju te tipa uzorkovanog tkiva.

Kowalski i sur. (2016) proučavaju zajednice gljiva u nadzemnim dijelovima običnog jasena s obzirom na dva stadija razvoja simptoma. Izolacije vrše iz inicijalnih nekrotičnih lezija te iz mrtvih vršnih dijelova stabljika i grančica, kako bi identificirali vrste koje bi neovisno ili nakon infekcije gljivom *Hymenoscyphus fraxineus* mogle sudjelovati u procesu odumiranja te one vrste koje sporuliraju na mrtvom tkivu stvarajući inokulum za nove zaraze. Iz početnih nekroza najčešće izoliraju vrstu *Hymenoscyphus fraxineus*, te potom *Alternaria alternata*, *Phomopsis velata* (Sacc.) Traverso, *Botryosphaeria stevensii*, *Gibberella avenacea* R.J. Cook, *Fusarium lateritium* i *Phomopsis* spp., dok u mrtvom tkivu najčešće pronalaze *Phomopsis velata*, *Botryosphaeria stevensii*, *Lophiostoma corticola*, *Phomopsis* spp., *Sirodothis* sp. te *Valsa cypri* (Tul.) Tul. & C. Tul. Identificirane vrste opisuju kao endofite, oportunističke patogene te saprotrofe čiju je ulogu u odumiranju potrebno dodatno razjasniti kroz daljnja istraživanja.

Kako bi razjasnili potencijalnu ulogu vrsta gljiva koje su uz *Hymenoscyphus fraxineus* najčešće izolirane iz simptomatičnih stabljika i grana u odumiranju običnog jasena, Kowalski i sur. (2017) ispituju njihovu patogenost u testovima inokulacije mladih jasenovih biljaka. Rezultati istraživanja su pokazali statistički značajnu razliku u patogenosti između vrsta, pri čemu je *Hymenoscyphus fraxineus* vrsta najveće patogenosti, a redom je slijede *Botryosphaeria stevensii* i *Valsa cypri* koje su pokazale veću patogenost u odnosu na ostale vrste obuhvaćene istraživanjem. Vrste *Fusarium lateritium* i *Fusarium solani* su uzrokovale simptome statistički slične onima nastalima na kontrolnim biljkama koje nisu inokulirane.

Osim istraživanja pridolaska vrsta u simptomatičnim tkivima sa svrhom otkrivanja potencijalnih patogena, provode se istraživanja zajednica gljiva na stablima običnog jasena različitog zdravstvenog stanja kako bi se utvrdilo imaju li pronađene vrste ulogu u očuvanju vitalnosti stabala koja nisu zahvaćena odumiranjem (Haňáčková i sur. 2017). Autori navode kako su saprotrofne vrste gljiva češće izolirane u proljeće, dok su one patogene brojnije zimi. Također utvrđuju da je broj pronađenih vrsta veći u zdravim stablima, te da, iako su dvije vrste roda *Diaporthes* u većem broju izolirane iz zdravih u odnosu na simptomatična stabla, nema statistički značajne razlike između zajednica gljiva koje se javljaju na stablima zahvaćenim odumiranjem i onima koja su vizualno zdrava.

Dio provedenih istraživanja na problematici odumiranja običnog i poljskog jasena je usmjeren na potencijalnu ulogu patogenih vrsta roda *Phytophthora*. U pokusima mogućnosti širenja vrste *Phytophthora ramorum* iz rasadnika na ostala stabla je utvrđeno kako je lišće običnog jasena osjetljivo na infekciju, dok se deblo pokazalo otpornim u testovima patogenosti inokulacijom u tkivo mladih stabala, jednako kao i deblo poljskoga jasena (Brasier i Jung 2004). Jung i Nechwatal (2008) na sličan način ispituju patogenost vrste *Phytophthora gallica* T. Jung & Nechw. na običnom jasenu, zaključujući kako se radi o biljnoj vrsti visoke otpornosti na infekcije. Do sličnih rezultata, odnosno zaključaka kako je običan jasen vrsta otporna na infekcije dolaze i Mrázková i sur. (2013) u ispitivanju osjetljivosti stabljika jasenovih sadnica na vrste *Phytophthora multivora* P.M. Scott & T. Jung i *Phytophthora plurivora* T. Jung & T.I. Burgess, te Durães (2015) u pokusima inokulacije stabljika mladih biljaka te tla u kojem su rasle vrstama *Phytophthora plurivora* te *Phytophthora alni*.

S druge strane, Orlikowski i sur. (2011) u Poljskoj i Danskoj otkrivaju prisutnost četiri vrste roda *Phytophthora* u tlu odumirućih sastojina običnog jasena kao i na nekrotičnim lezijama na korijenu i donjem dijelu debla jasenovih stabala, od kojih tri poznate (*P. cactorum* (Lebert & Cohn) J. Schröt., *P. plurivora*, *P. gonapodyides*) te jednu nepoznatu vrstu imenovanu kao

Phytophthora takson salixsoil. Od nabrojanih vrsta tri su pokazale patogenost (*P. cactorum*, *P. plurivora* i *P.* taxon salixsoil) na korijenu, deblu i listovima običnog jasena u pokusima inokulacije samih biljaka te na sitnom korijenju sadnica u pokusima inokulacije tla, zbog čega autori zaključuju kako ovi gljivama slični organizmi sudjeluju u odumiranju sastojina običnog jasena, moguće kao predisponirajući čimbenici za pridolazak patogene gljive *Hymenoscyphus fraxineus*.

Istraživanje uloge vrsta roda *Phytophthora* u odumiranju poljskoga jasena provode Akilli i sur. (2013b) u Turskoj u sastojinama sa simptomima odumiranja koji nisu karakteristični za infekciju patogenom *Hymenoscyphus fraxineus*. Izolacijama iz tla utvrđuju prisutnost vrste *Phytophthora* takson salixsoil te potvrđuju njenu patogenost na stabljikama dvogodišnjih sadnica poljskoga jasena, navodeći je kao primarnog uzročnika odumiranja istraživanih jasenovih sastojina.

Osim u jasenovim sastojinama, u Europi je dosad provedeno nekoliko istraživanja usmjerenih na identifikaciju gljivama sličnih organizama u tlu i njihovu potencijalnu ulogu u procesu odumiranja i u drugim nizinskim šumskim ekosustavima. Tako je u sastojinama hrasta lužnjaka različitog zdravstvenog stanja u Njemačkoj (Jung i sur. 2000), Italiji (Vettraino i sur. 2002), Švedskoj (Jönsson i sur. 2003), Austriji (Balcì i Halmschlager 2003b), Turskoj (Balcì i Halmschlager 2003a) i Poljskoj (Jankowiak i sur. 2014) utvrđeno kako postoji određena povezanost pronađenih vrsta roda *Phytophthora* u tlu i zdravstvenog statusa stabala. Dio dosad provedenih istraživanja usmjerenih prvenstveno na identifikaciju vrsta roda *Phytophthora*, također opisuje prisutnost vrsta rodova *Pythium* i *Phytopythium* u šumskim tlima, ali bez potvrde njihovog utjecaja na zdravstveno stanje stabala (Jung i sur. 2000, Balcì i Halmschlager 2003b, a, Jönsson i sur. 2003, Jankowiak i sur. 2015). Osim u tlu, vrste rodova *Phytophthora* i *Pythium* su identificirane u riječnim tokovima u blizini zaraženih šumskih područja u Poljskoj i Ukrajini (Matsiakh i sur. 2016).

1.5 Ciljevi i hipoteze istraživanja

S obzirom da je odumiranje šumskih vrsta drveća posljedica djelovanja različitih abiotičkih i biotičkih čimbenika koji na zdravstveno stanje stabala utječu istovremeno ili se sukcesivno izmjenjuju, svrha ovog istraživanja je bila ispitati ulogu gljiva i gljivama sličnih organizama u odumiranju poljskoga jasena koje je posljednjih nekoliko godina u velikoj mjeri zabilježeno u Republici Hrvatskoj. Pritom je istraživanje bilo usmjereno na pronalaženje i identifikaciju gljiva i njima sličnih organizama u okolnom tlu te na korijenovom sustavu i donjem dijelu debla jasenovih stabala kako bi se uz prijašnja istraživanja koja su se uglavnom odnosila na nadzemne dijelove stabala, poglavito krošnju, dobio sveobuhvatan uvid u ulogu navedenih skupina organizama u odumiranju. Kako se najveći kompleksi sastojina poljskoga jasena nalaze u gornjoj Posavini, za istraživanje su odabrane prirodne sastojine smještene u tom području. S obzirom na podatke i rezultate sličnih istraživanja opisanih u prethodnim poglavljima, u ovome radu su postavljeni sljedeći ciljevi, koji su s obzirom na one početno zamišljene dodatno prošireni tijekom napretka samog istraživanja:

⇒ utvrditi taksonomske jedinice gljiva i gljivama sličnih organizama koje dolaze na korijenovom sustavu i donjem dijelu debla poljskoga jasena te okolnom tlu u sastojinama s problemom odumiranja koristeći različite metode uzorkovanja, izolacije i identifikacije,

⇒ kategorizirati identificirane taksonomske jedinice prema načinu života i ishrane,

⇒ usporediti raznolikost skupina utvrđenih taksonomskih jedinica, odnosno njihovu distribuciju s obzirom na zdravstveno stanje stabala, kategoriju uzorka (mikrolokaciju izolacije) te geografsku lokaciju uzorkovanja,

⇒ odrediti postoji li povezanost između prisutnih taksonomskih jedinica te simptoma i stupnja osutosti krošnje, odnosno narušavaju li prisutne taksonomske jedinice zdravstveno stanje poljskoga jasena,

⇒ odrediti postoji li povezanost identificiranih taksonomskih jedinica s geografskim lokacijama uzorkovanja,

⇒ utvrditi je li osutost krošnje dobar pokazatelj zdravstvenog stanja korijena i donjeg dijela debla poljskoga jasena u sastojinama s problemom odumiranja,

⇒ utvrditi jesu li u tlu sastojina poljskoga jasena sa simptomima odumiranja prisutne patogene vrste roda *Phytophthora*.

U skladu s postavljenim ciljevima rada, očekuje se kako će rezultati potvrditi sljedeće hipoteze:

⇒ U tlu, na korijenovom sustavu i donjem dijelu debla poljskoga jasena postoji velik broj neidentificiranih i/ili u Republici Hrvatskoj dosad nezabilježenih taksonomskih jedinica koje pripadaju gljivama i njima sličnim organizmima.

⇒ Velik broj gljiva i njima sličnih organizama koji žive u tlu i na korijenovom sustavu pripadaju simbiotskim gljivama, saprotrofima i parazitima (patogenima).

⇒ Postoji razlika u raznolikosti skupina taksonomskih jedinica, odnosno njihovoj distribuciji s obzirom na zdravstveno stanje stabala, kategoriju uzorka (mikrolokaciju izolacije) te geografsku lokaciju uzorkovanja.

⇒ Postoji povezanost između prisutnih taksonomskih jedinica te simptoma i stupnja osutosti krošnje, odnosno one utječu na zdravstveno stanje poljskoga jasena.

⇒ Postoji povezanost identificiranih taksonomskih jedinica s geografskim lokacijama uzorkovanja.

⇒ Osutost krošnje je dobar pokazatelj zdravstvenog stanja korijena i donjeg dijela debla poljskoga jasena u sastojinama s problemom odumiranja.

⇒ U tlu sastojina poljskoga jasena sa simptomima odumiranja su prisutne patogene vrste roda *Phytophthora*.

Kako gljive i njima slični organizmi mogu mijenjati način života i ishrane s obzirom na stanje u kojem se nalaze, okolišne čimbenike te stanje dostupne biljke, istraživanje neće biti ograničeno samo na poznate patogene, već će obuhvatiti sve vrste koje je moguće izolirati u datom vremenu i mjestu, kako bi se dobio uvid u njihov mogući utjecaj na zdravstveno stanje stabala, čime će se ujedno postaviti temelj za naknadna dodatna istraživanja pojedinih vrsta ukoliko se to pokaže potrebnim. Osim gljiva obuhvatiti će se i gljivama slični organizmi zbog njihove sve izraženije uloge u odumiranju šumskih ekosustava. Uzimajući u obzir činjenicu da je dosad poznat malen broj vrsta navedenih organizama u odnosu na procijenjeno stanje brojnosti, očekivani rezultat istraživanja je ujedno i doprinos poznavanju bioraznolikosti i rasprostranjenosti gljiva i gljivama sličnih organizama u šumskim ekosustavima Republike Hrvatske.

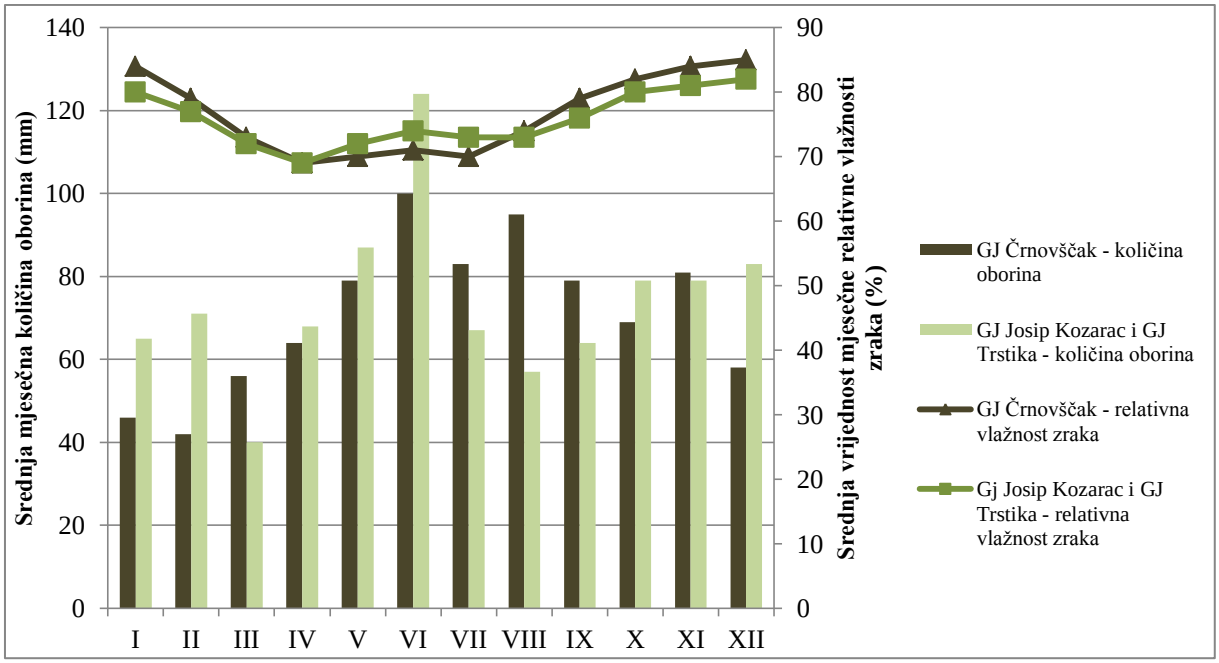
2. MATERIJALI I METODE RADA

2.1 Područje istraživanja

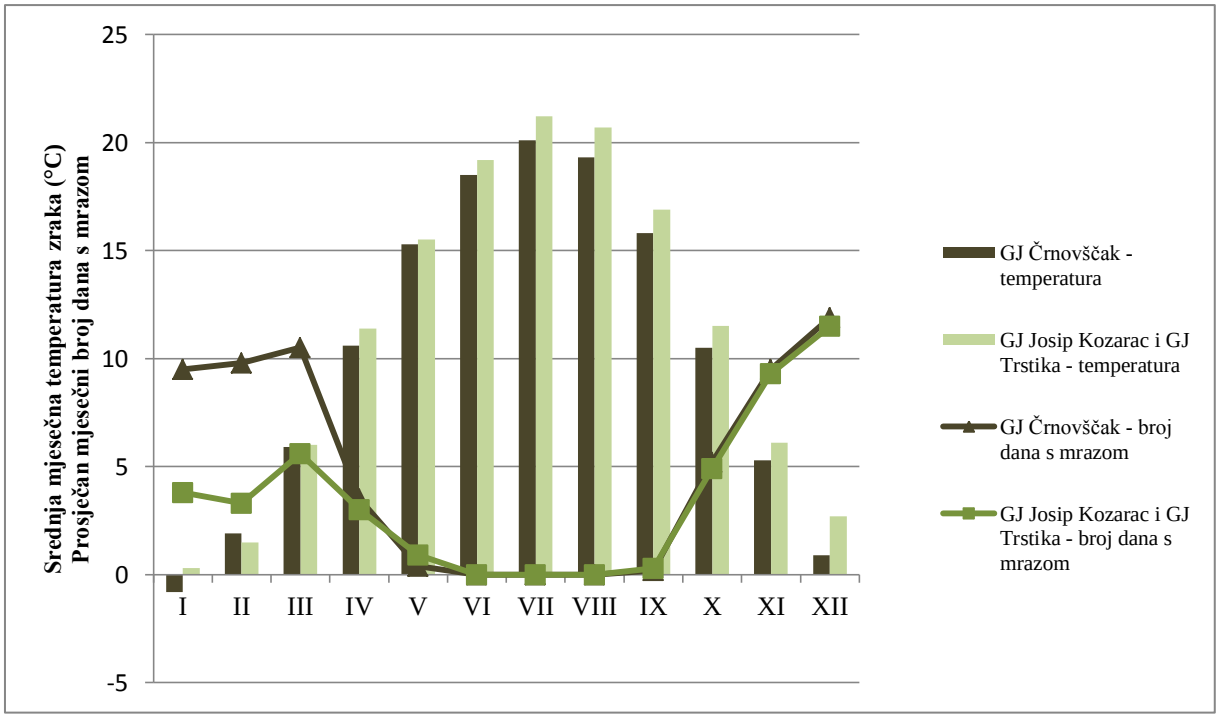
Istraživanje je provedeno u prirodnim sastojinama u kojima postoji problem odumiranja poljskoga jasena na području gornje Posavine kako ga definiraju Škorić i sur. (1989), Gračan i sur. (1995) te Anić (2001), jer se tamo nalaze najveći kompleksi šuma poljskoga jasena u Republici Hrvatskoj (Anić 2001). Lokacije uzorkovanja su obuhvatile GJ Josip Kozarac na području šumarije Lipovljani (UŠP Zagreb), GJ Črnovščak na području šumarije Dugo Selo (UŠP Zagreb) te GJ Trstika na području šumarije Novska (UŠP Nova Gradiška). Općeniti podaci o hidrografskim i klimatskim prilikama za šire područje istraživanja su preuzeti iz trenutno važećih osnova gospodarenja za svaku od nabrojanih gospodarskih jedinica.

Sve tri obuhvaćene gospodarske jedinice su pod većim ili manjim utjecajem posljedica regulacije prirodnih vodotoka. GJ Črnovščak se nalazi u nizinskom poplavnom području rijeke Save i njenih pritoka Črnec, Zelina i Lonja koji su u prošlosti regulirani izgradnjom nasipa, produbljenjem i proširenjem korita te ravnanjem toka na mjestima izraženog meandriranja zbog čega danas potoci Črnec i Zelina više imaju karakteristike kanala nego prirodnih tokova. Na području GJ je također radi odvodnje s poljoprivrednih površina prokopana mreža kanala koji se spajaju na prirodne vodotoke te jednim dijelom presijecaju šumske komplekse (Osnova gospodarenja za GJ „Črnovščak“, 2009). Iako rijeka Sava nigdje ne dotiče sastojine GJ Josip Kozarac, smatra se prevladavajućim razvojnim čimbenikom tog prostora putem podzemnih i poplavnih voda te kroz razne pritoke na kojima su također vršene određene regulacije (Osnova gospodarenja za GJ „Josip Kozarac“, 2015). Vodni režim GJ Trstika je također pod velikim utjecajem rijeke Save te njenih pritoka, čijom je regulacijom te prokopavanjem drugih kanala za odvodnju došlo do isušivanja velikog broja niza (Osnova gospodarenja za GJ „Trstika“, 2011).

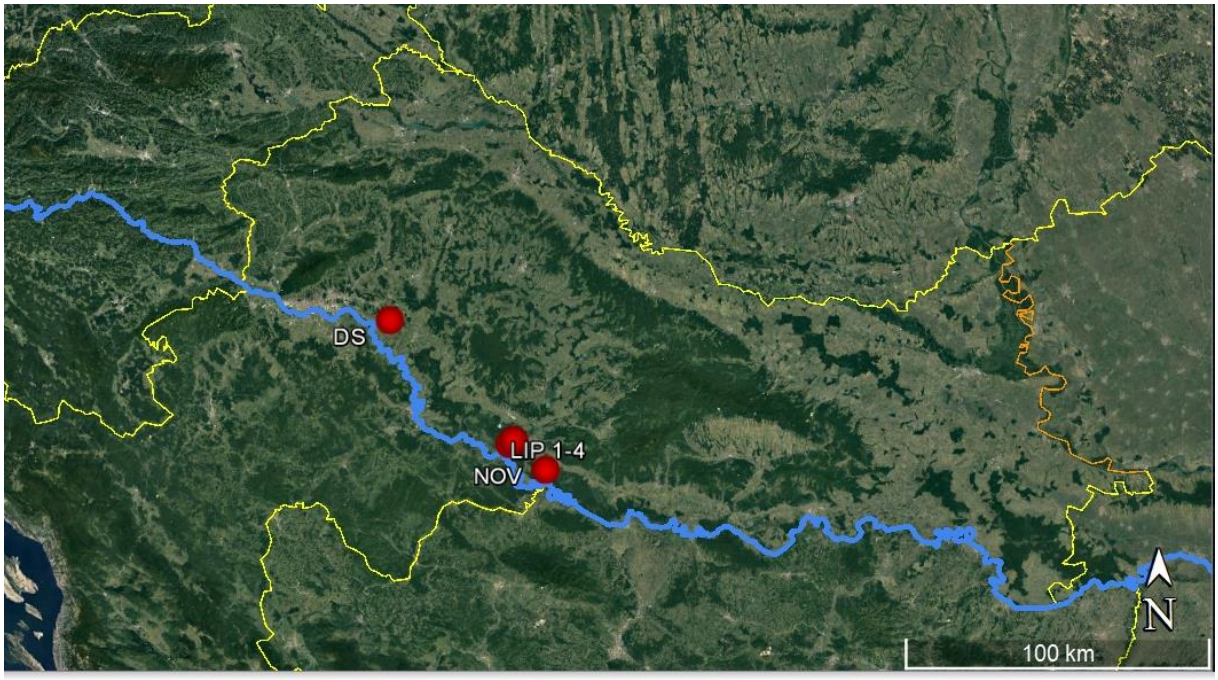
Pregled prosječnih vrijednosti osnovnih parametara klime je prikazan grafički, pri čemu su za GJ Črnovščak korišteni klimatski podaci meteorološke postaje Zagreb Maksimir za razdoblje 1961.-1990. godine, dok su za GJ Josip Kozarac i GJ Trstika korišteni podaci meteorološke postaje Lipovljani za isto razdoblje (Slika 4, Slika 5).



Slika 4. Grafički prikaz srednjih mjesečnih količina oborina i srednjih vrijednosti relativne vlažnosti zraka po mjesecima za razdoblje od 1961. do 1990. godine za istraživane gospodarske jedinice



Slika 5. Grafički prikaz srednjih mjesečnih temperatura zraka i prosječnog broja dana s mrazom po mjesecima za razdoblje od 1961. do 1990. godine za istraživane gospodarske jedinice



Slika 6. Lokacije uzimanja uzoraka (DS - Dugo Selo odsjek 16g; LIP 1-4 - Lipovljani odsjeci 74a, 74b, 80a, 71d; NOV - Novska odsjek 37b)

Na područjima šumarija Dugo Selo i Novska je odabrana po jedna sastojina, odnosno odsjek, u kojima su provedena sva uzorkovanja, dok su na području šumarije Lipovljani odabrane četiri sastojine, međusobno smještene u neposrednoj blizini te unutar jedne gospodarske jedinice (Slika 6).

Na području šumarije Dugo Selo su uzorci sakupljani u mješovitoj sastojini poljskoga jasena i crne johe (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.), s udjelom poljskoga jasena u drvnoj zalihi od 35,46 %, te u kojoj je jasen nastao iz sjemena, a joha iz panja (Tablica 4). Stabla crne johe nisu narušenog zdravstvenog stanja, za razliku od stabala poljskoga jasena koja u većem broju pokazuju simptome odumiranja. Zbog češćih progala u sklopu u sloju grmlja pridolazi obična kupina (*Rubus fruticosus* agg.).

Na području kojim gospodari šumarija Lipovljani su stabla uzorkovana u odsjecima 74a, 74b, 80a te 71d u gospodarskoj jedinici Josip Kozarac. Iako je odsjek 74a mješovita sastojina hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.) s manjim udjelom poljskoga jasena (udio u ukupnoj drvnoj zalihi = 16,11 %), mjestimice se u odsjeku nalaze depresije u kojima se dulji vremenski period zadržava voda, zbog čega tu u većim skupinama prirodno pridolazi poljski jasen, koji je u trenutku provođenja istraživanja pokazivao simptome odumiranja. U susjednom odsjeku 74b, staroj sastojini hrasta lužnjaka i poljskoga jasena (udio u ukupnoj drvnoj zalihi = 33,94 %), na južnom dijelu pridolazi samo poljski jasen (na približno 0,5 ha) uglavnom narušenog zdravstvenog stanja. U navedenim su odsjecima uzorkovanja izvršena na

stablima poljskoga jasena koja čine opisane veće skupine unutar sastojina hrasta lužnjaka. Preostala dva odsjeka na području šumarije Lipovljani u kojima su izvršena uzorkovanja, 80a i 71d, su čiste srednjedobne sastojine poljskoga jasena nastale iz sjemena, u kojima su također primijećeni simptomi odumiranja na stablima (Tablica 4). U navedenim je sastojinama sloj grmlja slabije razvijen te u sloju prizemnog rašća u čistim jasenicima uglavnom pridolazi drijemovac (*Leucojum aestivum* L.).

Tablica 4. Osnovni podaci o sastojinama u kojima je izvršeno uzorkovanje preuzeti iz važećih osnova gospodarenja

Lokacija uzorkovanja	Uređajni razred	Fitocenoza	Starost (godine)	Bonitet	Tip tla
Dugo Selo, GJ Črnovščak, 16g	Poljski jasen iz sjemena	Šuma poljskoga jasena s kasnim drijemovcem	30	I	Močvarno glejno (euglej) - epiglej
Lipovljani, GJ Josip Kozarac, 74a	Hrast lužnjak iz sjemena	Šuma hrasta lužnjaka i običnoga graba	24	II	Močvarno glejno (euglej) - epiglej
Lipovljani, GJ Josip Kozarac, 74b	Hrast lužnjak iz sjemena	Šuma hrasta lužnjaka s velikom žutilovkom	137	II	Močvarno glejno (euglej) - epiglej
Lipovljani, GJ Josip Kozarac, 80a	Poljski jasen iz sjemena	Šuma poljskoga jasena s kasnim drijemovcem	45	I	Močvarno glejno (euglej) - epiglej
Lipovljani, GJ Josip Kozarac, 71d	Poljski jasen iz sjemena	Šuma poljskoga jasena s kasnim drijemovcem	40	I	Močvarno glejno (euglej) - epiglej
Novska, GJ Trstika, 37b	Poljski jasen iz sjemena	Šuma poljskoga jasena s kasnim drijemovcem	25	I	Močvarno glejno (euglej) - amfiglej

Na području šumarije Novska su uzorkovanja izvršena u odsjeku 37b gospodarske jedinice Trstika u čistoj sastojini poljskoga jasena na nizi (Tablica 4), u kojoj samo pojedinačno pridolaze stabla drugih vrsta drveća kao što su crna joha i hrast lužnjak. U sloju grmlja gusto pridolazi čivitnjača (*Amorpha fruticosa* L.). Poljski jasen je, kao i na prethodnim lokacijama, u vrijeme sakupljanja uzoraka pokazivao simptome odumiranja.

2.2 Istraživanje pridolaska gljiva i gljivama sličnih organizama u okolnom tlu i na stablima različitog zdravstvenog stanja

Kako su neki od ciljeva ovog istraživanja bili usporediti taksonomske jedinice gljiva i gljivama sličnih organizama s obzirom na njihov pridolazak na stablima različitog zdravstvenog stanja te odrediti postoji li povezanost između utvrđenih taksona te kategorije osutosti krošnje, na svakoj je od prethodno opisanih lokacija, odnosno gospodarskih jedinica, odabrano po 30 stabala različitog zdravstvenog stanja na kojima i oko kojih su se sakupljali uzorci za potrebe izolacije navedenih organizama u razdoblju od kraja travnja do kraja rujna 2016. godine.

2.2.1 Odabir stabala i procjena kategorije zdravstvenog stanja

Za potrebe ovog istraživanja je kao indikator zdravstvenog stanja stabala odabrana osutost krošnje (Prpić 1992, Dobbertin i Brang 2001) koja se na terenu procjenjivala prema prilagođenoj metodologiji Međunarodnog programa za procjenu i motrenje utjecaja zračnog onečišćenja na šume, takozvanog ICP Forests (Lakatos i sur. 2014, Potočić i sur. 2016). Stabla su na temelju osutosti procijenjene u odnosu na teoretsko referentno stablo (najbolje stablo određene vrste drveća uzimajući u obzir sve stanišne uvjete, dob stabla i dr.) svrstana u tri kategorije osutosti krošanja (Tablica 5), odnosno tri kategorije zdravstvenog stanja (Slika 7), pri čemu su se stabla u zdravstvenoj kategoriji 1 smatrala zdravima, u zdrav. kategoriji 2 stablima narušenog zdravstvenog stanja, a u zdrav. kategoriji 3 odumirućim stablima, odnosno onima koja imaju najveći rizik odumiranja (Dubravac i sur. 2011). Mrtva stabla sa osutošću krošnje od 100 % se nisu uzimala u obzir. Procjena se vršila uz pomoć dalekozora kako bi se izuzela ona stabla čija je osutost krošnje posljedica djelovanja kukaca defolijatora (npr. *Stereonychus fraxini* Deg.).

Tablica 5. Kategorije osutosti krošanja, odnosno zdravstvenog stanja stabala s obzirom na postotak gubitka lišća

Klasa, stupanj osutosti krošnje te postotak gubitka lišća prema Pravilniku o načinu motrenja oštećenosti šumskih ekosustava (NN 76/2013, 122/2014)			Kategorija zdrav. stanja, stupanj osutosti krošnje te postotak gubitka lišća korišteni u ovom istraživanju		
0	nema osutosti	0-10 %	1	nema osutosti ili blaga osutost	0-25 %
1	blaga osutost	11-25 %			
2	umjerena osutost	26-60 %	2	umjerena osutost	26-60 %
3	jaka osutost	61-99 %	3	jaka osutost	61-99 %
4	mrtvo stablo	100 %	-	-	-

Slika 7. Kategorije zdravstvenog stanja 1, 2 i 3 stabala poljskoga jasena (gledano slijeva)

2.2.2 Sakupljanje uzoraka na terenu

Na svakoj lokaciji, odnosno gospodarskoj jedinici, je odabrano 30 stabala poljskoga jasena, od toga po 10 iz svake kategorije zdravstvenog stanja, s kojih su sakupljani uzorci korijena i donjeg dijela debla te uzorci tla u njihovoj neposrednoj blizini (Prilog 1).

Poduzorci tla su uzimani na četiri međusobno nasuprotne točke na rubu projekcije krošnje na tlo, odnosno na udaljenosti od 0,5 do 1 m od baze debla, ovisno o promjeru krošnje promatranog stabla (Slika 8). Dubina uzimanja poduzoraka je ovisila o stanišnim i sastojinskim prilikama (vlažnost tla, prisutnost i struktura sloja prizemnog rašća i grmlja) te je iznosila 10 do 20 cm. Poduzorci tla su odmah na terenu pomiješani u jedan uzorak volumena približno dvije litre za svako stablo (Akilli i sur. 2013b).

Slika 8. Uzimanje poduzoraka tla na četiri međusobno nasuprotne točke na rubu projekcije krošnje na tlo

Na svakom je uzorkovanom stablu iskopana jedna korijenova žila duljine do najviše 1 m počevši od baze debla, zajedno sa sitnim bočnim i terminalnim korijenjem (Bakys i sur. 2011). Uzorci donjeg dijela debla su uzimani pomoću Presslerovog svrdla (promjera 5,15 mm), na dvije međusobno nasuprotne strane debla, osim u slučajevima gdje su na deblima postojali vidljivi simptomi poput uleknuća, diskoloracija i/ili nekroza, kada su uzorci uzimani na prijelazu simptomatičnog u zdravo tkivo (Lygis i sur. 2005). Uzorkovanje donjeg dijela debla je vršeno na najmanjoj mogućoj visini od tla, što je s obzirom na duljinu ručke svrdla iznosilo 20 cm, a sakupljeni izvrci su bili promjera približno 0,5 cm te duljine 10 do 15 cm, ovisno o promjeru donjeg dijela debla te gustoći godova (Slika 9).

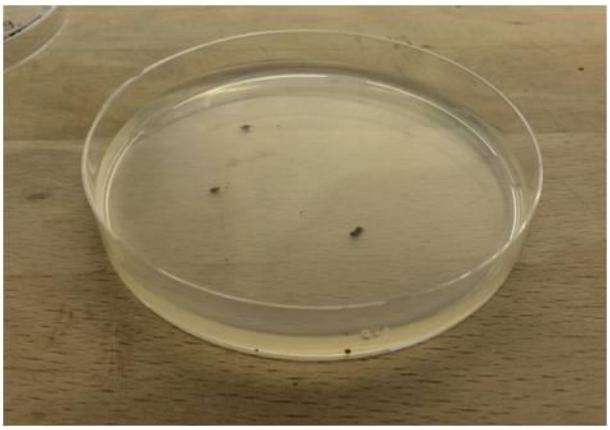
Sav alat korišten na terenu za uzimanje uzoraka je očišćen te steriliziran prskanjem etanolom (C_2H_5OH, 70 %) prije uzorkovanja svakog sljedećeg stabla. Svi uzorci su odmah na terenu spremljeni u zasebne zatvorene plastične vrećice i pohranjeni u rashladnu torbu te isti ili najkasnije sljedeći dan transportirani na daljnju obradu u Laboratorij za patologiju drveća Zavoda za zaštitu šuma i lovno gospodarenje na Šumarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Slika 9. Uzimanje uzoraka korijena i donjeg dijela debla

2.2.3 Izolacija gljiva i gljivama sličnih organizama iz uzoraka tla i biljnog tkiva

Izolacija iz tla je vršena pomoću dvije neposredne (Slika 10) te jedne posredne metode. Prva je metoda uključivala višestruko razrjeđivanje vodene suspenzije tla (*soil dilution plate method*), gdje je 1 g tla raspršeno u 10 ml sterilne destilirane vode (sterilizacija u autoklavu na 121 °C, 20 min) korištenjem magnetske miješalice (300 – 400 o/min, 20 min), a potom je serijskim razrjeđenjem u sterilnoj destiliranoj vodi dobivena suspenzija konačne koncentracije 1.000 x manje u odnosu na početnu. Jedan mililitar razrijeđene suspenzije je ravnomjerno pipetiran na dno Petrijeve zdjelice te prekriven s približno 20 ml tekuće hranjive podloge ohlađene na 45 – 55 °C (Waksman 1922).

Druga metoda izolacije iz tla je uključivala ravnomjerno postavljanje usitnjenih komadića tla (*soil plate method*) mase 0,001 g na dno Petrijeve zdjelice te prekrivanje s približno 20 ml tekuće hranjive podloge ohlađene na 45 – 55 °C (Warcup 1950).



Slika 10. Dvije neposredne metode izolacije gljiva i GSO iz tla korištene u istraživanju

Trećom, posrednom metodom (*soil baiting method*) se prvenstveno nastojalo otkriti prisutnost gljivama sličnih organizama u tlu, pri čemu je korištena djelomično prilagođena metoda potapanja tla (Themann i Werres 1999). Od svakog uzorka tla je po 250 ml ravnomjerno raspoređeno u plastične posude dimenzija 23,5 × 15 × 5 cm te potopljeno ultračistom vodom (0,055 μS/cm) volumena 500 ml, tako da je površina vode bila 1 do 2 cm iznad površine tla. Zatim je na površinu vode postavljeno 3 do 5 svježe ubranih mladih listova jasena (*Fraxinus* spp.) ili javora klena (*Acer campestre* L.) te razvijenih listova rododendrona (*Rhododendron catawbiense* Michx.), koji su prethodno temeljito oprani vodom iz slavine te zatim površinski sterilizirani uranjanjem u 0,5 % otopinu klorovodične kiseline (HCl(aq)) u trajanju od 5 min, potom isprani u sterilnoj destiliranoj vodi te ostavljeni da se u potpunosti osuše u laminarnom kabinetu za rad u atmosferi čistog zraka. Posude s postavljenim listovima su lagano zaklopljene ostavljane na sobnoj temperaturi i prirodnom režimu svjetlosti 2 do 8 dana, odnosno do pojave prvih simptoma infekcije gljiva ili gljivama sličnih organizama na lišću (kloroza i nekroza). Listovi na kojima su se razvili simptomi su oprani vodom iz slavine, površinski sterilizirani uranjanjem u 0,04 % otopinu natrijevog hipoklorita (NaOCl) na 1 do 2 minute, zatim tri puta isprani u sterilnoj destiliranoj vodi te ostavljeni da se u potpunosti osuše unutar laminarnog kabineta za rad u atmosferi čistog zraka. Komadići listova s rubova kloroza i/ili nekroza približne veličine 3 × 3 mm su postavljeni na hranjive podloge u Petrijeve zdjelice.

Sa uzoraka korijenovih žila su uzeta dva poduzorka tkiva na rubovima vidljivih diskoloracija i/ili nekroza, odnosno iz zdravog tkiva u slučajevima gdje su simptomi izostali. Sa svake je korijenove žile uzet i uzorak sitnog bočnog ili terminalnog korijenja. Poduzorci su temeljito isprani vodom iz slavine uz grubo četkanje kako bi se uklonili ostaci tla te sve ostale nečistoće, te potom površinski sterilizirani uranjanjem u 0,5 % otopinu natrijevog hipoklorita

na tri minute, zatim u 70 % etanol na jednu minutu te naposljetku isprani tri puta u sterilnoj destiliranoj vodi i ostavljeni da se osuše unutar laminarnog kabineta za rad u atmosferi čistog zraka (Greenfield i sur. 2015). Poduzorci sitnog korijenja duljine približno 1 cm su na hranjive podloge postavljeni zajedno sa korom, dok su sa poduzoraka korijenovih žila uklonjeni kora te floem i uzeti komadići tkiva drva veličine približno 5 × 5 mm.

Svaki od dva uzeta poduzorka donjeg dijela debla (dva izvrtka) je površinski steriliziran zasebnom metodom. Prva je metoda uključivala uranjanje izvrtaka na nekoliko sekundi u 0,5 % otopinu klorovodične kiseline te ispiranje u sterilnoj destiliranoj vodi, nakon čega su se izvrci sušili u laminarnom kabinetu za rad u atmosferi čistog zraka, dok je druga metoda uključivala uranjanje izvrtaka u 70 % etanol na 1 do 2 sekunde te potom kratko izlaganje plamenu (Hoff i sur. 2004). Izvrci su bili prerezani na 2 – 3 kraća dijela te u tom obliku postavljeni na hranjive podloge u Petrijeve zdjelice.

Sav korišteni pribor i alat (skalpeli, pincete i sl.) za pripremu tla i biljnog tkiva su prije svakog sljedećeg uzorka sterilizirani uranjanjem u 96 % etanol te kratko izloženi plamenu dok etanol ne ishlapi. Plastično i stakleno posuđe koje se upotrebljavalo je prije postupka izloženo UV svjetlosti u laminarnom mikrobiološkom kabinetu na najmanje 30 minuta.

Za izolaciju gljiva i gljivama sličnih organizama iz svih kategorija uzoraka su korištene Petrijeve zdjelice promjera 9 cm s prosječno 20 ml PDA (Potato Dextrose Agar, ThermoFisher Scientific, SAD) hranjive podloge s dodatkom antibiotika (streptomicin sulfat, 0,2 g/1 L, Sigma-Aldrich, SAD). Petrijeve zdjelice s tlom i biljnim tkivom za izolaciju su inkubirane u tami na temperaturi od 19 – 21 °C u komori rasta te svakodnevno praćene u vremenskom razdoblju od mjesec dana. Dobiveni miceliji su redovito presađivani u nove Petrijeve zdjelice na PDA hranjive podloge kako bi se dobile čiste kulture.

2.2.4 Identifikacija taksonomskih jedinica izoliranih organizama molekularnim metodama

Dobivene čiste kulture micelija su na temelju morfoloških značajki promatranih golim okom i mikroskopom (Olympus BX41) grupirane u morfotipove. Promatrane morfološke značajke su uključivale boju i teksturu micelija, obojenje hranjive podloge, boju na poleđini Petrijeve zdjelice, brzinu rasta, te veličinu, boju i oblik spora ukoliko su bile prisutne. Za većinu je utvrđenih morfotipova odabran jedan reprezentativni izolat za identifikaciju vrste molekularnim metodama, dok su za neke morfotipove koji su bili zastupljeni s velikim brojem

izolata ili su na temelju morfoloških značajki prepoznati kao vrste potencijalnih patogena, odabrana dva do četiri izolata.

Izolacija DNA iz micelija je vršena fenol-kloroform metodom uz određene prilagodbe (Allemann i sur. 1999). Izolati su uzgojeni na MEA (Malt Extract Agar, ThermoFisher Scientific, SAD) hranjivim podlogama na sterilnim celofanskim diskovima (Cellophane Membrane Backing, Bio-Rad, SAD) u tami na 21 °C. Približno 50 mg micelija starog sedam dana je odvagano za svaki izolat. Tkivo je homogenizirano mehanički u mikroepruvetama (2 ml) uz prisustvo tekućeg dušika (N_2), nakon čega je uzorcima dodano po 800 µl pufera za lizu (20 mM Tris, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10 % SDS, pH 8) i jednak volumen smjese fenol:kloroform:izoamilni alkohol u omjeru 25:24:1 (Slika 11).

Slika 11. Neke od faza protokola za izolaciju genomske DNA: priprema 50 mg micelija, homogenizacija tkiva, pipetiranje pufera za lizu

Zatim su mikroepruvete podvrgnute miješanju na vrtložnoj miješalici te potom centrifugiranju (Eppendorf AG 5804 R laboratorijska centrifuga) 10 minuta na 5000×g, nakon čega je vodena faza otpipetirana u novu mikroepruvetu u koju je dodan jednak volumen otopine kloform:izoamilni alkohol omjera 24:1. Nakon ponovnog miješanja na vrtložnoj miješalici i centrifugiranja 10 minuta na 5000×g, vodena faza je otpipetirana u novu mikroepruvetu u koju je dodan jednak volumen izopropanola. Slijedilo je ručno miješanje mikroepruveta okretanjem te centrifugiranje 20 minuta na 15000×g i 4 °C, nakon čega je supernatant dekantiran, a dobiveni talog DNA ispran s 500 µl ledeno-hladnog 70 % etanola. Nakon centrifugiranja 3 minute na 15000×g i 4 °C je etanol dekantiran, a talog DNA osušen približno 10 minuta na zraku te naposljetku otopljen u 50 µl TE pufera (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) te u tom obliku pohranjen na 4 °C do daljnje obrade. Provjera kvalitete i

kvantitete dobivene DNA je vršena na biofotometru (Eppendorf AG; Plus 6132) pri čemu je početna DNA razrijeđena 50 x u TE puferu (5 µl početne otopine DNA + 245 µl TE pufera).

U lančanoj reakciji polimerazom (PCR) je umnažana ITS regija izolirane genomske DNA (Schoch i sur. 2012) korištenjem početnica ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') i ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') (White i sur. 1990). Konačne koncentracije pojedinih sastojaka smjese za PCR (Tablica 6) te uvjeti reakcije (Tablica 7) su određeni empirijski. Uzorci DNA čije ciljane sekvence nisu uspješno umnožene pri navedenim uvjetima su pročišćeni od zaostale RNA te pretaloženi solima i etanolom, nakon čega su podvrgnuti reakcijama u promijenjenim uvjetima i s dodatkom aditiva u smjesi (Tablica 8).

Tablica 6. Sastav smjese za izvođenje PCR reakcije

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

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

Tablica 7. Uvjeti lančane reakcije polimerazom

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

Kako bi se iz uzoraka DNA uklonila zaostala RNA, u svaki su uzorak dodana 2 µl ribonukleaze A koncentracije 10 µg/ml (Rnase A, ThermoFisher Scientific, SAD), nakon čega su uzorci inkubirani 30 minuta na 37 °C. Za ponovno taloženje DNA je uzorcima dodana otopina natrijevog klorida (5 M NaCl, Sigma-Aldrich, SAD) do konačne koncentracije 0,3 M te nakon ručnog miješanja okretanjem mikroepruvete, dvostruki volumen hladnog 96 % etanola (u odnosu na postojeći volumen u mikroepruveti). Uzorci su ponovno ručno

pomiješani okretanjem mikroepruveta te pohranjeni na -80 °C na 30 minuta, nakon čega su centrifugirani 10 minuta pri 13000×g i 4 °C. Nastali supernatant je uklonjen pipetiranjem, a dobivenom talogu DNA dodano 500 µl hladnog 75 % etanola. Nakon što su uzorci još jednom centrifugirani 10 minuta pri 13000×g i 4 °C, etanol je dekantiran a talog DNA otopljen u 50 µl TE pufera nakon što se sušio na zraku približno 10 minuta (Sambrook i Russel 2001).

Tablica 8. Prilagodba uvjeta i/ili komponenata prvotne PCR reakcije

Nezadovoljavajući rezultat u prvotnoj PCR reakciji	Prilagodba uvjeta i komponenata prvotne PCR reakcije	Broj uzoraka genomske DNA podvrgnutih prilagođenoj reakciji
izostanak PCR produkta	smanjenje temperature sparivanja početnica na 47 °C, dodatak 4 % DMSO u reakciju	8
pojava nespecifičnih PCR produkata	smanjenje temperature sparivanja početnica na 47 °C, dodatak 4 % DMSO u reakciju, smanjenje broja ciklusa na 30	1
	povećanje temperature sparivanja početnica na 57 °C, dodatak 4 % DMSO u reakciju, skraćivanje vremena sparivanja početnica i produljivanja lanca DNA na 30, odnosno 60 s	1
	povećanje temperature sparivanja početnica na 57 °C, dodatak 4 % DMSO u reakciju	6
PCR produkti nedovoljne koncentracije	povećanje broja ciklusa na 38	7

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

Specifičnost, duljina (pb) te približna koncentracija dobivenih PCR produkata su provjerene elektroforezom u 1,5 % agaroznom gelu (0,375 g agaroze u 25 ml 1x TBE (89 mM Tris-borat, 2 mM EDTA) pufera, Lonza Rockland, SAD) pri naponu od 55 V te u trajanju od 90 minuta. U gel se prethodno dodavala boja za vizualizaciju nukleinskih kiselina GelStar Nucleic Acid Gel Stain (Lonza Rockland, SAD) konačne koncentracije 1x. U jažice gela je nanošeno po 1 µl svakog PCR produkta pomiješanog s 4 µl sterilne destilirane vode (razrjeđenje zbog

visoke koncentracije dobivenih produkata) te 1 µl pufera za nanošenje uzoraka (6x DNA Loading Buffer, TransGen Biotech, Kina). Tijekom svake izvođene elektroforeze je u jednu od jažica nanošen molekularni marker poznate veličine (100 bp DNA Ladder, TransGen Biotech, Kina) radi procjene duljine i koncentracije PCR produkata. Nakon završene elektroforeze su PCR produkti na gelu vizualizirani te fotografirani pomoću UV transiluminatora s kamerom (Bio-Imaging Systems DNR, MiniBIS Pro) te računalnog programa GelCapture. Približna duljina PCR produkata je određena pomoću računalnog programa GelAnalyzer 2010a (www.GelAnalyzer.com).

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

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

2.2.5 Podjela identificiranih taksona u kategorije prema načinu života i ishrane te taksonomskom položaju

Kako gljive i njima slični organizmi često mijenjaju način života i ishrane ovisno o vanjskim utjecajnim čimbenicima te životnoj fazi, ne postoji njihova jedinstvena podjela u jednoznačne kategorije te je za potrebe ovog istraživanja odabrano nekoliko najčešćih prema definicijama različitih skupina autora (De Bary 1879, Sherwood i Carroll 1974, Lewis 1985, Petrini 1986, Carroll 1988, Carlile i Watkinson 1994, Redman i sur. 2001, Stone i sur. 2004, Porras-Alfaro i Bayman 2011).

Prema ovdje navedenim izvorima, kategorije načina života i ishrane u koje su se svrstavali identificirani taksoni gljiva i GSO u ovome istraživanju su: saprotrofi, paraziti i endofiti

(mikorizne gljive nisu utvrđene). Svi taksoni za koje do trenutka predaje doktorskog rada nisu postojale objavljene i javno dostupne informacije na temelju kojih bi bili svrstani u prethodne kategorije su grupirani u zasebnu kategoriju NP (nije poznato). Taksoni su razvrstavani u kategorije prvenstveno s obzirom na njihov odnos prema vrstama roda *Fraxinus*, te potom s obzirom na njihov odnos prema drugim vrstama drveća ili prema drugim biljnim vrstama na temelju dostupnih podataka.

Taksonomske jedinice i grupe gljiva su također razvrstane prema taksonomskom položaju, odnosno pripadnosti pojedinom odjelu unutar carstva gljiva (*Fungi*), dok je taksonomska grupa gljivama sličnih organizama (*Pythium/Phytopythium*) svrstana u odjel *Oomycota* carstva *Straminipila* (Adl i sur. 2012, Marano i sur. 2017). Podaci o taksonomskom položaju su provjereni na mrežnoj stranici www.indexfungorum.org.

2.2.6 Statistička analiza podataka

U statističkim analizama su korištene apsolutne vrijednosti broja taksona te broja izolata unutar pojedinih taksona koji su zabilježeni u istraživanju. Utjecaj broja uzorkovanih stabala na broj dobivenih taksona je prikazan krivuljama akumulacije vrsta, za koje su parametri izračunati pomoću računalnog programa EstimateS 9.1.0 (Colwell 2013), a grafički prikaz izrađen u računalnom programu Microsoft Office Excel 2007.

Distribucija utvrđenih taksona gljiva i GSO s obzirom na pojedine kategorije uzoraka (tlo, korijen, deblo), kategorije zdravstvenog stanja (1, 2 i 3) te geografske lokacije uzorkovanja (Dugo Selo, Lipovljani, Novska) je prikazana pomoću Vennovog dijagrama te kvalitativnog i kvantitativnog Sørensenovog indeksa sličnosti (Sørensen 1948). Navedeni indeksi se temelje na usporedbi zajedničkih i različitih taksona između zajednica, pri čemu kvalitativni u obzir uzima samo prisustvo, odnosno odsutnost taksona, dok kvantitativni u obzir uzima i broj jedinki, a njihove se vrijednosti kreću od 0 za potpuno različite zajednice do 1 za one potpuno jednake. Vennovi dijagrami su izrađeni pomoću računalnih programa Venny 2.1. (Oliveros 2007) te eulerAPE (Micallef i Rodgers 2014), a Sørensenovi indeksi izračunati u računalnom programu EstimateS 9.1.0.

Raznolikost vrsta utvrđenih zajednica gljiva i GSO na različitim kategorijama uzorka, kategorijama zdravstvenog stanja i geografskim lokacijama uzorkovanja je prikazana pomoću Shannonovog indeksa raznolikosti (H) koji u obzir uzima broj jedinki i broj vrsta u nekom uzorku (Shannon 1948) te indeksa ujednačenosti vrsta (*Evenness*, E) koji pokazuje koliko je brojnost jedinki jednakomjerno raspoređena po utvrđenim vrstama u uzorku (Buzas i Gibson

1969) (Tablica 9). Veća vrijednost Shannonovog indeksa označava i veću raznolikost zajednice, dok se vrijednost indeksa ujednačenosti kreće od 0 do 1, pri čemu 0 označava potpunu dominantnost jedne vrste, dok 1 označava potpuno jednaku zastupljenost svih vrsta u zajednici s obzirom na broj jedinki. Indeksi su izračunati u računalnom programu PAST (Hammer i sur. 2001). Pomoću Kruskal-Wallis testa je ispitano postoji li statistički značajna razlika u vrijednostima navedenih indeksa između različitih kategorija zdravstvenog stanja stabala posebno za svaku od obuhvaćenih geografskih lokacija uzorkovanja.

Tablica 9. Formule korištenih indeksa raznolikosti u istraživanju

Korišteni indeks	Formula
Shannonov indeks raznolikosti (H)	$-\sum_i \frac{n_i}{n} \ln \frac{n_i}{n}$
Indeks ujednačenosti (E)	e^H/S

n – ukupni broj izolata, S – broj taksona

U analizi utjecaja utvrđenih taksona na kategoriju zdravstvenog stanja stabala te njihove povezanosti s geografskim lokacijama je korišten Fisherov egzaktni test, pri čemu se u obzir uzimao broj izolata samo onih taksona koji se javljaju na najmanje tri stabla unutar pojedine kategorije uzorka (deblo, korijen, tlo) (Dickie i sur. 2002). Za grafički prikaz navedenih odnosa je korištena Analiza korespondencije izrađena u računalnom programu PAST. Povezanost osutosti krošanja i simptoma prisutnih na deblu i korijenu uzorkovanih stabala je ispitana primjenom hi-kvadrat testa.

Statističke analize su rađene u računalnim programima IBM SPSS Statistics (IBM, Armonk SAD) i SAS (SAS Institute, Cary, SAD). Za testiranje hipoteza prilikom svih analiza je korišten stupanj značajnosti od 5% ($p < 0.05$).

2.3 Utvrđivanje prisutnosti potencijalno patogenih gljivama sličnih organizama iz roda *Phytophthora* u tlu

Nastavno na prethodno opisani dio istraživanja su u listopadu i studenom 2016. godine ponovno uzimani uzorci tla u istim gospodarskim jedinicama kako bi se dodatno provjerila prisutnost GSO u tlu s naglaskom na identifikaciju patogenih vrsta roda *Phytophthora*. Time se ujedno nastojao izbjeći potencijalni utjecaj klimatskih čimbenika na uspješnost izolacije s obzirom da su svi prethodni uzorci uzimani u vegetacijskom razdoblju, a iako ne postoji točno određeno doba godine za sakupljanje uzoraka jer aktivnost GSO varira iz godine u godinu, dosad se najučinkovitijim pokazalo jesensko sakupljanje (Streito i Gibbs 1999). Tlo je

sakupljano u neposrednoj blizini istih stabala koja su obuhvaćena i u prethodnom dijelu istraživanja, ali na manjem uzorku koji je obuhvatio sve tri kategorije zdravstvenog stanja.

2.3.1 Uzorkovanje tla na terenu

U svakoj je gospodarskoj jedinici uzorkovano tlo oko 10 stabala različitog zdravstvenog stanja iskapanjem po tri monolita tla zajedno sa sitnim korijenjem približnih dimenzija 25 × 25 × 25 cm (bez listinca i humusa) na tri različite točke na rubu projekcije krošnje, odnosno na udaljenosti 0,5 – 1 m od debla, ovisno o promjeru krošnje svakog istraživanog stabla. Tri su poduzorka odmah na terenu homogenizirana u jedan uzorak pri čemu se plastična vreća u kojoj je vršen postupak mijenjala između svakog istraživanog stabla. Naposljetku se za daljnje laboratorijske analize uzimao poduzorak volumena približno dvije litre za svako stablo (Jankowiak i sur. 2014).

2.3.2 Laboratorijska obrada uzoraka

Uzorci su obrađeni u Laboratoriju za patologiju drveća Zavoda za zaštitu šuma i lovno gospodarenje na Šumarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu u vremenskom periodu od 24 h od vremena sakupljanja, pri čemu je korištena djelomično prilagođena metoda potapanja tla (Slika 12) (Themann i Werres 1999). Uzorci su još jednom dobro promiješani te je po 250 ml svakog ravnomjerno raspoređeno u plastične posude dimenzija 23,5 × 15 × 5 cm i potopljeno ultračistom vodom (0,055 μS/cm) volumena 500 ml, tako da je površina vode bila 1 do 2 cm iznad površine tla. Nakon inkubacije tla u poklopljenim posudama na sobnoj temperaturi (18 – 22 °C) u trajanju od tri dana (Vettraino i sur. 1999), na površinu vode su postavljeni svježe ubrani i razvijeni listovi rododendrona (*Rhododendron catawbiense* Michx.) i lovorvišnje (*Prunus laurocerasus* L.). Po uzorku tla je postavljeno 3 – 5 listova, koji su prethodno oprani vodom iz slavine uz lagano četkanje kako bi se uklonile veće nečistoće te zatim kratko isprani u sterilnoj destiliranoj vodi i ostavljeni da se u potpunosti osuše unutar laminarnog kabineta za rad u atmosferi čistog zraka. Ovako pripremljene posude su lagano zaklopljene ostavljane na sobnoj temperaturi i prirodnom režimu svjetlosti 2 do 8 dana, odnosno do pojave prvih simptoma infekcije gljivama sličnih organizama na lišću (kloroza i nekroza).

Slika 12. Laboratorijska obrada uzoraka tla metodom potapanja

2.3.3 Izolacija gljivama sličnih organizama iz simptomatičnih listova

Za izolacije gljivama sličnih organizama iz simptomatičnih listova su pripremljene hranjive podloge 10 % CJA (Carrot Juice Agar, sok mrkve iz biološkog uzgoja, dmBIO Karottensaft, Njemačka) te 10 % VJA (Vegetable Juice Agar, povrtni sok iz biološkog uzgoja, Biotta Breuss, SAD) s dodatkom antibiotika (streptomicin sulfat, 0,2 g/1 L, Sigma-Aldrich, SAD). Za pripremu 1 litre navedenih podloga je u 100 ml soka dodan 1 g kalcijevog karbonata ($CaCO_3$) uz stalno miješanje na 150 °C u trajanju od 20 minuta, te zatim 900 ml destilirane vode i 15 g agar-agara, uz stalno miješanje na 250 °C u trajanju od približno 30 minuta (Jeffers 2007). Hranjive su podloge potom sterilizirane u autoklavu 20 minuta na 121 °C, te je u njih dodan antibiotik nakon što su ohlađene na približno 55 °C. Za rast čistih kultura su se koristile hranjive podloge PDA (ThermoFisher Scientific, SAD) i MEA (ThermoFisher Scientific, SAD) pripremljene prema uputama proizvođača.

Slika 13. Primjer lisnog tkiva iz kojeg je vršena izolacija gljivama sličnih organizama

Listovi s vidljivim simptomima infekcije su oprani vodom iz slavine, zatim površinski sterilizirani uranjanjem u 0,04 % otopinu natrijevog hipoklorita (NaOCl) na dvije minute, te tri puta isprani u sterilnoj vodi nakon čega su ostavljeni da se u potpunosti osuše unutar laminarnog kabineta za rad u atmosferi čistog zraka (Themann i Werres 1999). Komadići listova veličine približno 3 × 3 mm sa rubova klorotičnog i/ili nekrotičnog tkiva su okomito uronjeni u hranjive podloge tako da su većim dijelom površine bili u dodiru s antibiotikom čime se nastojao spriječiti razvoj bakterija (Slika 13). Ovako pripremljene Petrijeve zdjelice su stavljene na inkubaciju u komoru rasta u tamu na 21 °C. Rast micelija je praćen svakodnevno tri tjedna uz redovito presađivanje kako bi se dobile čiste kulture.

2.3.4 Indukcija tvorbe sporangija

Kako dobivene čiste kulture nisu samostalno razvile generativne morfološke značajke koje bi omogućile potvrdu pripadnosti gljivama sličnim organizmima, na micelijima je inducirana tvorba sporangija korištenjem tri različite nesterilne suspenzije tla (Slika 14). Kockice hranjivih podloga zajedno s pripadajućim micelijem površine približno 0,5 cm^2 su izrezane s ruba kultura starih 4 do 7 dana te u sterilnim Petrijevim zdjelicama promjera 9 cm potopljene

nesterilnom suspenzijom tla volumena 25 ml. Petrijeve zdjelice su zatvorene plastičnom folijom te inkubirane 24 do 48 sati na sobnoj temperaturi i prirodnom režimu svjetlosti, nakon čega se micelij promatrao i fotografirao pod svjetlosnim mikroskopom (Olympus BX41 s ugrađenom digitalnom kamerom Moticam Pro 252A) pomoću računalnog programa Motic Images Plus 2.0 ML. Za indukciju tvorbe sporangija su korištene nesterilne suspenzije tla koncentracija 1 %, 1,5 % i 5 %. Prve dvije suspenzije su dobivene miješanjem odgovarajuće mase tla (10, odnosno 15 g) u 1 L ultračiste vode (0,055 µS/cm) na magnetskoj miješalici u trajanju od četiri sata. Nakon dodatnih 12 h mirovanja tijekom kojih se tlo istaložilo, gornji vodeni sloj je filtriran gravitacijskom metodom kroz filter papir (Grade 388, Boeco Germany) (Jeffers i Aldwinckle 1987, Drenth i Sendall 2001). Za treću je otopinu 50 g tla potopljeno jednom litrom ultračiste vode te ostavljeno da odstoji 48 sati, nakon čega je vodeni sloj bez taloga filtriran gravitacijskom metodom kroz filter papir (Grade 388, Boeco Germany) (Jung i sur. 1996). Suspenzije su čuvane u hladnjaku u tami na 4 °C.

Slika 14. Indukcija tvorbe sporangija: nesterilne suspenzije tla različitih koncentracija (lijevo) i kockice hranjive podloge s micelijem u nesterilnoj suspenziji tla (desno)

2.3.5 Identifikacija vrsta molekularnim metodama

Za molekularne analize je odabrano šest izolata morfoloških značajki karakterističnih za gljivama slične organizme, odnosno dva izolata sa svake istraživane lokacije. Izolacija genomske DNA je izvršena prema već opisanoj prilagođenoj fenol-kloroform metodi (Allemann i sur. 1999) u Molekularno-biološkom laboratoriju Zavoda za šumarsku genetiku, dendrologiju i botaniku na Šumarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, a kvaliteta i kvantiteta dobivene DNA su provjerene na biofotometru (Eppendorf AG; Plus 6132) pri čemu je početna DNA razrijeđena 50 x u TE (Tris-EDTA, pH 8,0) puferu (5 µl početne otopine DNA + 245 µl TE pufera).

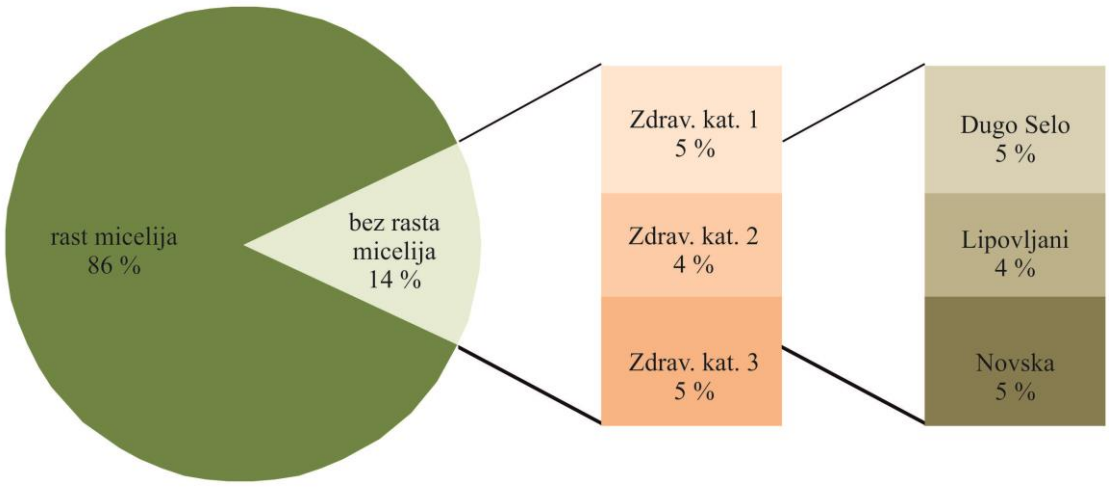
Daljnja analiza dobivenih uzoraka DNA je izvršena u laboratoriju tvrtke InovaGen d.o.o. (Zagreb, Hrvatska), a obuhvaćala je lančanu reakciju polimerazom (PCR) kako bi se umnožila ciljana ITS regija te određivanje slijeda nukleotida (sekvence) navedene regije radi identifikacije vrsta. Pritom je za umnažanje ciljane sekvence korišten par početnica ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') i ITS6 (5'GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG3') (White i sur. 1990, Cooke i sur. 2000) te protokol usavršen za vrste roda *Phytophthora* (Grünwald i sur. 2011). Izolati su identificirani usporedbom dobivenih sekvenci s postojećima u bazi gena NCBI GenBank primjenom algoritma BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul i sur. 1990).

3. REZULTATI

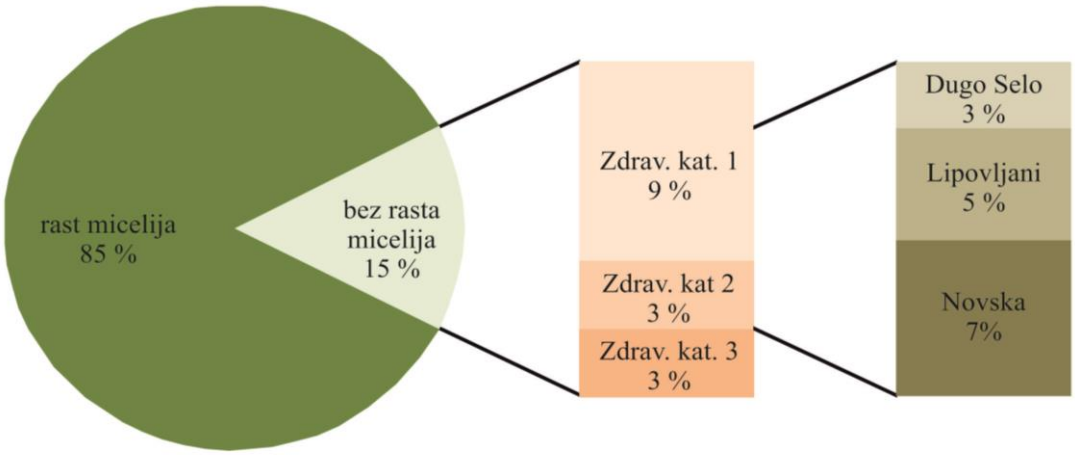
3.1 Identificirane taksonomske jedinice gljiva i gljivama sličnih organizama u okolnom tlu i na stablima različitog zdravstvenog stanja

3.1.1 Uspješnost izolacije iz različitih uzoraka

Istraživanjem je obuhvaćeno 90 uzoraka tla iz kojih je pripremljeno 270 Petrijevih zdjelica s početnim materijalom na hranjivoj podlozi (primjena tri različite metode izolacije), 90 uzoraka korijena iz kojih je također pripremljeno 270 Petrijevih zdjelica (uzimanje tri poduzorka tkiva na različitim mjestima na korijenovoj žili) te 90 uzoraka donjeg dijela debla iz kojih je pripremljeno 180 Petrijevih zdjelica (uzimanje uzoraka na suprotnim stranama debla), to jest ukupno 720 Petrijevih zdjelica s početnim materijalom na hranjivoj podlozi iz kojih su potom presađivanjem dobivane čiste kulture micelija. Iz svih 90 uzoraka tla je izolirana barem jedna čista kultura micelija gljiva ili gljivama sličnih organizama. Od ukupno 270 poduzoraka tkiva korijena za izolaciju, iz njih 231, odnosno 86 %, je dobiven rast micelija (Slika 15), dok je od ukupno 180 sakupljenih uzoraka debla na njih 153, odnosno 85 % zabilježen rast micelija (Slika 16). Pritom je iz korijena i debla svakog stabla obuhvaćenog istraživanjem izoliran micelij najmanje jednog taksona gljiva.



Slika 15. Grafički prikaz postotnog udjela uzoraka korijena na kojima nije zabilježen rast micelija s obzirom na kategorije zdravstvenog stanja stabala i geografske lokacije uzorkovanja



Slika 16. Grafički prikaz postotnog udjela uzoraka donjeg dijela debla na kojima nije zabilježen rast micelija s obzirom na kategorije zdravstvenog stanja stabala i geografske lokacije uzorkovanja

Tablica 10. Najmanji, najveći i prosječan broj izolata i taksona po stablu za različite kategorije uzorka, kategorije zdravstvenog stanja i geografske lokacije uzorkovanja

Zdravstvena kategorija 1 (Dugo Selo/Lipovljani/Novska)						
	Izolati			Taksoni		
	Min	Max	Prosjek	Min	Max	Prosjek
Deblo	2/1/2	9/4/6	5/3/4	2/1/2	6/3/4	4/2/3
Korijen	3/2/3	9/10/11	5/6/6	2/2/2	7/7/5	4/4/3
Tlo	4/3/3	10/12/10	7/8/7	2/3/2	8/7/7	5/5/4
Zdravstvena kategorija 2 (Dugo Selo/Lipovljani/Novska)						
	Izolati			Taksoni		
	Min	Max	Prosjek	Min	Max	Prosjek
Deblo	2/2/1	6/6/8	4/4/3	1/1/1	4/6/4	3/3/2
Korijen	2/2/3	11/12/11	7/6/7	2/1/2	6/5/5	4/3/4
Tlo	1/4/3	11/9/13	7/7/7	1/2/3	7/8/5	5/4/4
Zdravstvena kategorija 3 (Dugo Selo/Lipovljani/Novska)						
	Izolati			Taksoni		
	Min	Max	Prosjek	Min	Max	Prosjek
Deblo	2/2/1	6/6/8	4/4/3	1/1/1	5/3/4	3/3/2
Korijen	2/2/3	11/12/11	7/6/7	2/1/2	6/6/5	4/3/4
Tlo	1/4/3	11/9/13	7/7/7	1/2/3	6/6/6	4/4/4

Iz uzoraka donjeg dijela debla su u prosjeku dobivena četiri izolata, odnosno tri taksona gljiva po stablu, dok je najveći broj iznosio devet izolata te šest taksona po stablu. Na uzorcima korijena je u prosjeku izolirano šest izolata, odnosno četiri taksona po stablu, uz najveći dobiveni broj izolata 12 te taksona sedam na jednom stablu. Iz uzoraka tla je u prosjeku dobiveno sedam izolata te četiri taksona po stablu, a najveći je zabilježeni broj iznosio 13 izolata, odnosno osam taksona po uzorku tla sakupljenom oko pojedinačnog stabla. Najmanji dobiveni broj izolata i taksona je na svim uzorcima bio jedan, osim na korijenu gdje su dobivena najmanje dva izolata po stablu. Broj dobivenih izolata i taksona po pojedinačnom stablu nije pokazao veća odstupanja s obzirom na različite kategorije uzorka, zdravstveno stanje stabala i geografsku lokaciju uzorkovanja (Tablica 10).

3.1.2 Uspješnost primjene molekularnih metoda u identifikaciji čistih kultura micelija

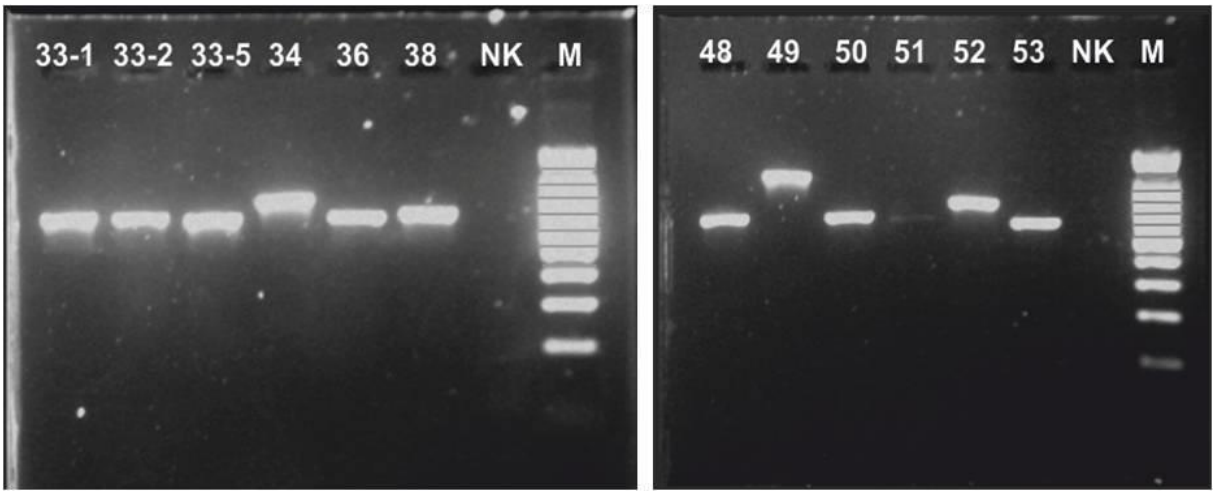
Genomska DNA zadovoljavajuće količine i kakvoće je izolirana iz ukupno 99 čistih kultura micelija (Tablica 11). Iako su neki uzorci pokazivali manje ili veće vrijednosti omjera očitanja apsorpcije (pokazatelja čistoće DNA) od optimalnih, većina (83) ih je bila pogodne kakvoće za lančanu reakciju polimerazom (Bruvo Mađarić 2007). Od 83 uzorka DNA čije su ciljane sekvence uspješno umnožene prema prvotno zamišljenim uvjetima i komponentama PCR reakcije, njih sedam je dalo PCR produkte niskih koncentracija zbog čega su uzorci dodatno obrađeni te podvrgnuti PCR reakciji s promijenjenim uvjetima, zajedno s preostalih 16 uzoraka koji nisu rezultirali produktom ili su rezultirali nespecifičnim produktom (poglavlje 2.2.4). U konačnici su iz svih 99 uzoraka genomske DNA dobiveni PCR produkti približne duljine 660 – 1200 pb (Slika 17), iz kojih su potom dobiveni slijedovi nukleotida (sekvence) duljine 513 – 933 pb nakon računalne obrade.

Tablica 11. Podaci o količini i kakvoći izolirane DNA

$N_{uzoraka}$ = 99	Koncentracija izolirane DNA (ng/µl)	OD_{260}/OD_{280}*	OD_{260}/OD_{230}**
Prosjek	1507,8	2,1	2,1
Minimum	277,0	1,2	1,2
Maksimum	4109,7	2,2	2,8

**omjer očitanja na 260 i 280 nm valne duljine, raspon vrijednosti za čistu DNA iznosi 1,8-2,0; <1,8 = kontaminacija proteinima; >2,0 = kontaminacija s RNA*

***omjer očitanja na 260 i 230 nm valne duljine, vrijednost za čistu DNA je veća od 1,8; <1,8 = kontaminacija proteinima, polifenolima i ugljikohidratima (Sambrook i Russel 2001)*



Slika 17. Primjer dobivenih PCR produkata na agaroznim gelovima; NK = negativna kontrola; M = molekularni marker; brojke označavaju uzorke DNA

3.1.3 Identificirani taksoni gljiva i gljivama sličnih organizama i njihova kategorizacija prema načinu života i ishrane te sistematici

U istraživanju je dobiveno ukupno 1497 izolata gljiva i gljivama sličnih organizama iz svih prikupljenih uzoraka koji su nakon molekularnih analiza svrstani u 80 taksona (Prilog 2). Od toga je njih 59 identificirano do razine vrste (*Species*), 18 do razine roda (*Genus*), jedan do razine porodice (*Familia*), jedan do razine reda (*Ordo*), te jedan do razine pododjela (*Subphylum*). Prvih 29 najčešćih taksona obuhvaća čak 89 % svih izolata, dok preostali 51 takson obuhvaća svega 11 % dobivenih izolata. Od toga je za 20 taksona izolacijom iz svih uzoraka dobiven samo jedan izolat te za dodatnih devet samo dva izolata (Prilog 3).

Najveći broj taksona, njih 34, su kategorizirani kao endofiti, slijede ih 23 taksona koji predstavljaju saprotrofe, dok kategorija parazita na biljnim vrstama (uključujući i poljoprivredne kulture) broji 12 taksona (Tablica 12 – 14). Za 11 taksona nije bilo moguće odrediti kategoriju prema dosad objavljenoj literaturi, ili zbog taksonomske razine identifikacije kojom pojedini taksoni obuhvaćaju više vrsta različitih po načinu života i ishrane, ili zbog manjka dostupnih podataka (Tablica 15). Nijedan takson nije svrstan u kategoriju mikoriznih gljiva.

Od ukupno 66 identificiranih vrsta u ovom istraživanju (59 taksona identificiranh do razine vrste + dvije vrste unutar taksona *Trichoderma* spp. + jedna vrsta unutar taksona *Armillaria* spp. + četiri vrste unutar taksona *Pythium/Phytopythium*), njih 27 je prema dostupnoj literaturi ranije utvrđeno u Republici Hrvatskoj (Tablica 16).

Tablica 12. Identificirani taksoni kategorizirani kao paraziti te njihova učestalost u pojedinim kategorijama uzorka (broj stabala na kojima su utvrđeni / broj dobivenih izolata)

Naziv taksona	Deblo	Korijen	Tlo	Ukupno
Armillaria (Fr.) Staude	7/9	8/26	-	**13*/35**
Aspergillus ruber Thom & Church	6/8	2/3	4/4	**12/15**
Dactylonectria vitis (A. Cabral, Rego & Crous) L. Lombard & Crous	-	3/4	1/1	**4/5**
Diaporthe cotoneastri (Punith.) Udayanga, Crous & K.D. Hyde	12/16	29/43	1/1	**40*/60**
Fusarium solani (Mart.) Sacc.	10/12	31/72	14/17	**44*/101**
Fusarium sporotrichioides Sherb.	4/4	5/5	3/4	**11*/13**
Ganoderma adspersum (Schulzer) Donk	9/11	6/9	4/4	**15*/24**
Gibberella fujikuroi (Sawada) Wollenw.	3/3	5/5	9/9	**14*/17**
Hymenoscyphus fraxineus (T. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya	2/3	6/21	-	**8/24**
Leucostoma persoonii (Nitschke) Höhn.	-	1/1	-	**1/1**
Pholiota adiposa (Batsch) P. Kumm.	1/1	1/1	7/8	**8*/10**
Pythium Pringsh./*Phytopythium* Abad, De Cock, Bala, Robideau, A.M. Lodhi & Lévesque	-	-	62/161	**62/161**

** ukupni broj stabala na kojima je takson utvrđen nije jednak zbroju stabala na kojima je utvrđen u pojedinim kategorijama uzorka jer je na nekim stablima istovremeno zabilježen u dvije ili sve tri kategorije*

Tablica 13. Identificirani taksoni kategorizirani kao endofiti te njihova učestalost u pojedinim kategorijama uzorka (broj stabala na kojima su utvrđeni / broj dobivenih izolata)

Naziv taksona	Deblo	Korijen	Tlo	Ukupno
Acremonium murorum (Corda) W. Gams	1/2	3/3	10/11	**14/16**
Alternaria Nees	10/10	4/4	5/5	**15*/19**
Beauveria bassiana (Bals.-Criv.) Vuill.	5/5	1/1	3/5	**8*/11**
Chaetomium funicola Cooke	-	3/3	3/3	**6/6**
Cladosporium cladosporioides (Fresen.) G.A. de Vries	12/17	29/56	6/8	**39*/81**
Clonostachys rosea (Link) Schroers, Samuels, Seifert & W. Gams	3/3	15/17	19/22	**30*/42**
Colletotrichum truncatum (Schwein.) Andrus & W.D. Moore	-	1/1	-	**1/1**
Epicoccum nigrum Link	5/5	4/4	4/4	**11*/13**
Gibberella baccata (Wallr.) Sacc.	1/1	-	1/1	**2/2**
Ilyonectria robusta (A.A. Hildebr.) A. Cabral & Crous	4/5	55/107	5/5	**58*/117**

Nastavak - Tablica 13. Identificirani taksoni kategorizirani kao endofiti te njihova učestalost u pojedinim kategorijama uzorka (broj stabala na kojima su utvrđeni / broj dobivenih izolata)

Naziv taksona	Deblo	Korijen	Tlo	Ukupno
Lecanicillium lecanii (Zimm.) Zare & W. Gams	2/2	-	-	**2/2**
Metacordyceps chlamydosporia (H.C. Evans) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora	-	-	1/1	**1/1**
Metarhizium marquandii (Massee) Kepler, S.A. Rehner & Humber	-	-	5/9	**5/9**
Metarhizium robertsii J.F. Bisch., S.A. Rehner & Humber	-	1/1	4/4	**5/5**
Microdiplodia Allesch.	-	2/5	2/2	**3*/7**
Nectria flavoviridis (Fuckel) Wollenw.	1/1	-	-	**1/1**
Nemania serpens (Pers.) Gray	4/7	1/1	-	**5/8**
Nemania Gray	-	3/4	1/1	**4/5**
Neobulgaria Petr.	-	1/2	-	**1/2**
Neonectria punicea (J.C. Schmidt) Castl. & Rossman	3/3	5/5	1/1	**9/9**
Penicillium glabrum (Wehmer) Westling	1/1	-	-	**1/1**
Penicillium ochrochloron Biourge	10/11	4/6	19/24	**32*/41**
Penicillium simplicissimum (Oudem.) Thom	-	-	1/1	**1/1**
Pezicula ericae (Sigler) P.R. Johnst.	-	1/1	-	**1/1**
Pezicula melanigena (T. Kowalski & Halmschl.) P.R. Johnst.	-	12/18	1/1	**13/19**
Pezicula Tul. & C. Tul.	1/1	-	-	**1/1**
Pseudeurotium bakeri C. Booth	6/9	4/5	7/11	**17/25**
Pseudopithomyces chartarum (Berk. & M.A. Curtis) J.F. Li, Ariyawansa & K.D. Hyde	1/1	-	2/3	**3/4**
Purpureocillium lilacinum (Thom) Luangsa-ard, Houbraken, Hywel-Jones & Samson	-	-	5/8	**5/8**
Talaromyces ucrainicus (Panas.) Udagawa	20/33	-	-	**20/33**
Talaromyces verruculosus (Peyronel) Samson, N. Yilmaz, Frisvad & Seifert	19/24	-	2/2	**20*/26**
Tolypocladium album (W. Gams) Quandt, Kepler & Spatafora	1/1	1/1	1/1	**3/3**
Tolypocladium cylindrosporum W. Gams	-	2/5	10/12	**11*/17**
Verticillium leptobactrum W. Gams	-	1/1	-	**1/1**

** ukupni broj stabala na kojima je takson utvrđen nije jednak zbroju stabala na kojima je utvrđen u pojedinim kategorijama uzorka jer je na nekim stablima istovremeno zabilježen u dvije ili sve tri kategorije*

Tablica 14. Identificirani taksoni kategorizirani kao saprotrofi te njihova učestalost u pojedinim kategorijama uzorka (broj stabala na kojima su utvrđeni / broj dobivenih izolata)

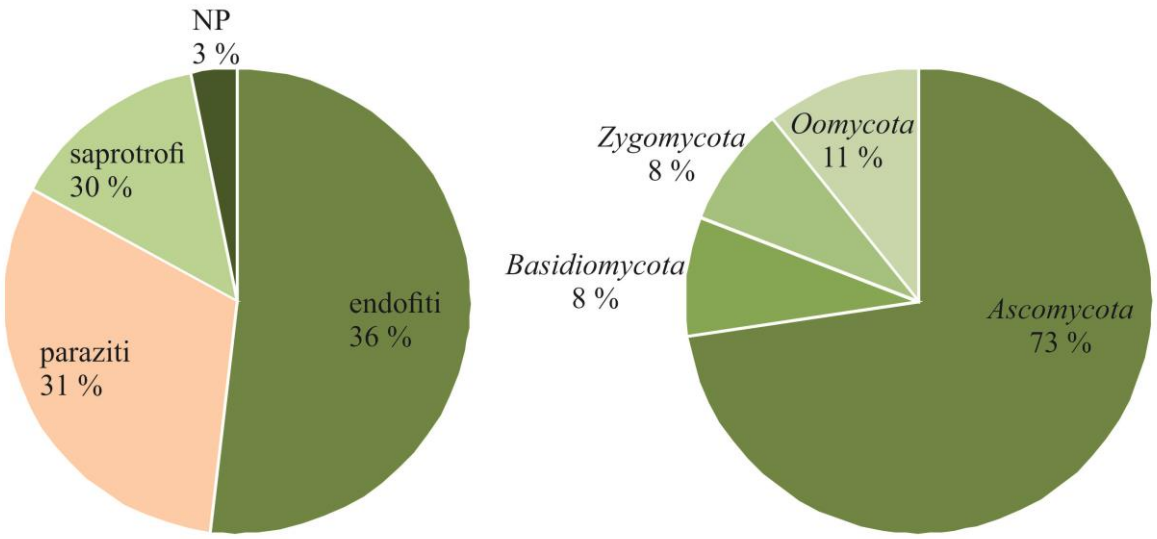
Naziv taksona	**Deblo**	**Korijen**	**Tlo**	**Ukupno**
Absidia Tiegh.	9/10	10/11	53/88	**62*/109**
Clonostachys candelabrum (Bonord.) Schroers	-	-	2/2	**2/2**
Coprinellus disseminatus (Pers.) J.E. Lange	4/4	3/6	2/2	**8*/12**
Coprinellus micaceus (Bull.) Vilgalys, Hopple & Jacq. Johnson	3/3	10/25	-	**13/28**
Coprinellus radians (Fr.) Vilgalys, Hopple & Jacq. Johnson	1/1	-	-	**1/1**
Dimorphospora foliicola Tubaki	-	2/3	-	**2/3**
Gongronella butleri (Lendn.) Peyronel & Dal Vesco	-	-	2/2	**2/2**
Gongronella Ribaldi	-	1/1	-	**1/1**
Hypoxylon perforatum (Schwein.) Fr.	1/1	-	-	**1/1**
Metapochonia bulbillosa (W. Gams & Malla) Kepler, Rehner & Humber	1/1	-	1/1	**2/2**
Mortierellomycotina Kerst. Hoffm., K. Voigt & P.M. Kirk	-	-	3/6	**3/6**
Mucor Fresen	-	-	4/8	**4/8**
Paraphaeosphaeria neglecta Verkley, Riccioni & Stielow	2/2	1/1	1/1	**3*/4**
Paraphaeosphaeria sporulosa (W. Gams & Domsch) Verkley, Göker & Stielow	1/1	-	-	**1/1**
Podospora Ces.	1/1	1/1	-	**2/2**
Psathyrella candolleana (Fr.) Maire	-	4/10	2/2	**6/12**
Pseudogymnoascus Raillo	-	1/1	2/2	**3/3**
Talaromyces purpureogenus Samson, N. Yilmaz, Houbraken, Spierenb., Seifert, Peterson, Varga & Frisvad	-	1/1	4/4	**5/5**
Trametes versicolor (L.) Lloyd	-	1/1	-	**1/1**
Trichoderma Pers.	47/73	30/61	64/104	**81*/238**
Westerdykella purpurea (Cain) Arx	-	-	1/1	**1/1**
Xylaria polymorpha (Pers.) Grev.	1/1	1/1	-	**2/2**
Xylaria primorskensis Y.M. Ju, H.M. Hsieh, Lar.N. Vassiljeva & Akulov	-	1/1	-	**1/1**

** ukupni broj stabala na kojima je takson utvrđen nije jednak zbroju stabala na kojima je utvrđen u pojedinim kategorijama uzorka jer je na nekim stablima istovremeno zabilježen u dvije ili sve tri kategorije*

Tablica 15. Identificirani taksoni za koje nije bilo moguće odrediti kategoriju načina života i ishrane na temelju dostupne literature te njihova učestalost u pojedinim kategorijama uzorka (broj stabala na kojima su utvrđeni / broj dobivenih izolata)

Naziv taksona	Deblo	Korijen	Tlo	Ukupno
Amauroascus albicans (Apinis) Arx	-	-	2/2	**2/2**
Cadophora Lagerb. & Melin	-	2/9	-	**2/9**
Chaetosphaeriaceae Réblová, M.E. Barr & Samuels	-	1/1	-	**1/1**
Daldinia pyrenaica M. Stadler & Wollw.	-	1/1	-	**1/1**
Fontanospora Dyko	-	1/1	-	**1/1**
Nectria canadensis Ellis & Everh.	-	-	1/1	**1/1**
Neonectria Wollenw.	1/1	2/2	2/2	**5/5**
Penicillium atrosanguineum B.X. Dong	4/5	-	3/3	**7/8**
Penicillium Link (1)	8/9	1/1	1/1	**10/11**
Penicillium Link (2)	1/1	1/1	3/4	**5/6**
Pleosporales Luttr. ex M.E. Barr	1/1	2/2	-	**2*/3**

** ukupni broj stabala na kojima je takson utvrđen nije jednak zbroju stabala na kojima je utvrđen u pojedinim kategorijama uzorka jer je na nekim stablima istovremeno zabilježen u dvije ili sve tri kategorije*



Slika 18. Udio dobivenih izolata prema kategorijama načina života i ishrane (lijevo) te sistematskoj pripadnosti odjelu (desno)

Najveći broj dobivenih izolata pripada taksonima kategoriziranim kao endofiti. Paraziti, iako predstavljeni s manjim brojem taksona od saprotrofa, su zastupljeni s većim brojem dobivenih izolata. Prema sistematskom položaju, 66 taksona pripada odjelu *Ascomycota*, osam odjelu *Basidiomycota*, te pet odjelu *Zygomycota*. Gljivama slični organizmi pripadaju odjelu

Oomycota carstva *Chromista* (*Straminipila*). Najveći broj dobivenih izolata također pripada odjelu *Ascomycota*, a potom ga slijedi odjel *Oomycota* (Slika 18, Prilog 2).

Tablica 16. Popis vrsta utvrđenih u ovom istraživanju koje su prema dostupnoj literaturi i ranije zabilježene u Republici Hrvatskoj

Naziv vrste	Komentar i citat izvora literature
Armillaria cepistipes (unutar taksona *Armillaria*)	parazit ili saprotrof na panjevima listopadnog drveća (Božac 2005)
Aspergillus ruber	na tekstilu (Čukman 1990)
Beauveria bassiana	entomopatogen (Pernek 2007)
Cladosporium cladosporioides	uzročnik promjene boje drva, utvrđena pod nazivom *Hormodendrum cladosporioides* (Bađun 1960)
Clonostachys rosea	u tlu sastojina poljskoga jasena (Petrač 2016)
Colletotrichum truncatum	parazit na zrnima soje (Ćosić i sur. 2008)
Coprinellus disseminatus	na panjevima i srušenim stablima (Božac 2005)
Coprinellus micaceus	na panjevima i mrtvim stablima (Božac 2005)
Coprinellus radians	na otpalim granama i mrtvim stablima (Božac 2005)
Diaporthe cotoneastri	na vinovoj lozi, utvrđena je pod nazivom *Phomopsis cotoneastri* (Kaliterna i sur. 2012)
Epicoccum nigrum	u nekrotiziranom drvu topola (*Populus* spp.), utvrđena je pod nazivom *Epicoccum purpurascens* (Diminić i sur. 2002)
Fusarium solani	u nekrotiziranom drvu topola (*Populus* spp.) (Diminić 2005)
Fusarium sporotrichioides	na korovu i biljnim ostacima (Ilić i sur. 2012)
Ganoderma adspersum	na više vrsta četinjača i listača (Tortrić 1970)
Gibberella fujikuroi	na plodu jabuke (*Malus* spp.), utvrđena je pod nazivom *Fusarium moniliforme* (Ivić i sur. 2006)
Hymenoscyphus fraxineus	na običnom i poljskom jasenu (Barić i Diminić 2010, Diminić 2015)
Leucostoma persoonii	na vinovoj lozi (Lendarić 2016)
Nemania serpens	na mrtvim granama i stablima listopadnog drveća, utvrđena pod nazivom *Hypoxylon serpens* (Božac 2005)
Neonectria punicea	na mrtvom drvu johe, utvrđena je pod nazivom *Nectria punicea* (Božac 2005)
Penicillium simplicissimum	na zrnju kukuruza (Cvjetković 2014)
Pholiota adiposa	na mrtvom drvu, najčešće na običnoj bukvi (Božac 2005)
Psathyrella candolleana	u šumskim staništima i parkovima (Božac 2005)
Pseudopithomyces chartarum	saprotrof na pokošenoj travi i slami pod nazivom *Pithomyces chartarum* (Kosalec 2004)
Talaromyces purpureogenus	na tekstilu (Čukman 1990)
Trametes versicolor	na mrtvom drvu listopadnih vrsta, rjeđe četinjača (Božac 2005)
Trichoderma harzianum (unutar taksona *Trichoderma* spp.)	parazit jestivih gljiva (Hatvani i sur. 2012)
Xylaria polymorpha	na otpalim granama obične bukve (Božac 2005)

3.1.4 Identificirani taksoni koji obuhvaćaju više različitih vrsta

Identificirani taksoni iznad taksonomskog ranga vrste se odnose na jednu vrstu gljive ili gljivama sličnog organizma (npr. *Neonectria* sp., *Absidia* sp. itd.), osim u slučajevima identificiranih rodova *Armillaria*, *Trichoderma* i *Pythium*/*Phytopythium*, gdje je zbog velike brojnosti izolata te vrlo sličnih ili jednakih morfoloških svojstava različitih vrsta unutar pojedinog roda u svaki od navedenih taksona uključeno više različitih vrsta, zbog čega se navode kao *Armillaria* spp., *Trichoderma* spp. te *Pythium*/*Phytopythium* spp.

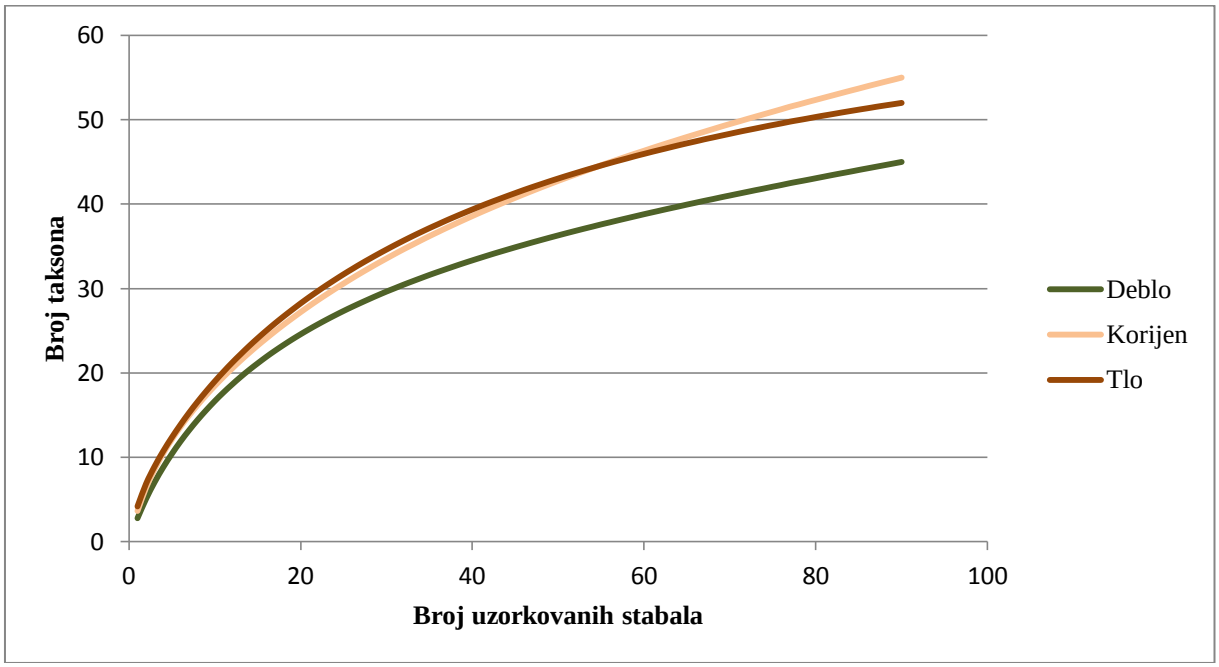
U istraživanju je ukupno dobiveno 35 izolata roda *Armillaria* na dvije lokacije (Dugo Selo i Novska) od kojih je sa svake odabran po jedan izolat za molekularnu identifikaciju vrste. Za izolat iz Novske je dobivena sekvenca duljine 577 parova baza koja je prema NCBI GenBank bazi identificirana kao *Armillaria cepistipes* sa 99 %-tnom podudarnošću sekvence, dok je za izolat iz Dugog Sela dobivena sekvenca duljine 581 parova baza koja je prema istoj bazi pokazala 99 %-tnu podudarnost te jednak uspjeh pogotka (Score) vrijednosti 1059 za tri različite vrste: *A. sinapina*, *A. gallica* i *A. cepistipes*, onemogućujući točnu identifikaciju. U nedostatku dodatnih informacija kao što su primjerice podaci o vegetativnoj kompatibilnosti izolata, odlučeno je kako se dobiveni izolati neće smatrati jednom vrstom, već će se u analizi rezultata promatrati kao više različitih vrsta roda *Armillaria*, odnosno navoditi kao *Armillaria* spp.

Dobiveni miceliji koji su morfološki grupirani u rod *Trichoderma* su učestalo izolirani iz uzoraka biljnog tkiva i tla na sve tri istraživane lokacije i zdravstvene kategorije stabala. Od ukupno dobivenih 238 izolata, četiri su odabrana za molekularnu identifikaciju vrste. Izolat dobiven s donjeg dijela debla stabla jake osutosti krošnje iz Novske je identificiran kao *Trichoderma harzianum* (podudarnost sekvence 99 %, uspjeh pogotka 1101), izolat dobiven iz donjeg dijela debla stabla jake osutosti krošnje iz Dugog Sela kao *T. hamatum* (podudarnost sekvence 99 %, uspjeh pogotka 1061), izolat dobiven s korijena stabla umjerene osutosti krošnje iz Lipovljana je identificiran samo do razine roda zbog niske podudarnosti sekvence iako je sekvenca vrlo srodna vrsti *T. harzianum* (podudarnost sekvence 96 %, uspjeh pogotka 972), dok je izolat dobiven s korijena stabla jake osutosti krošnje iz Lipovljana pokazao jednaku podudarnost sa sekvencama dviju vrsta, *T. gamsii* i *T. koningiopsis* (podudarnost sekvence 99 %, uspjeh pogotka 1074), zbog čega je također identificiran samo do razine roda. Zbog nehomogenih rezultata te velikog broja izolata je odlučeno kako će se svi miceliji navedenog roda svesti pod zajednički nazivnik te u analizi rezultata definirati kao *Trichoderma* spp.

Gljivama slični organizmi su izolirani isključivo iz uzoraka tla, pri čemu je iz 90 sakupljenih uzoraka za vrijeme vegetacijskog razdoblja dobiven ukupno 161 izolat, a iz dodatnih 30 uzoraka tla sakupljenih u drugome dijelu istraživanja ukupno 24 izolata, u oba slučaja na svim lokacijama i zdravstvenim kategorijama stabala. Šest odabranih izolata je molekularnim metodama identificirano kao četiri različite vrste koje pripadaju dvama različitim rodovima, *Pythium* i *Phytopythium.* Kako su vrste roda *Phytopythium* dugo smatrane vrstama roda *Pythium,* te se tek u novije vrijeme odvojile u poseban rod (Bala i sur. 2010, de Cock i sur. 2015), razlike u morfološkim karakteristikama između navedenih rodova nisu velike i često ih je teško razlikovati kao i same vrste unutar rodova. Zbog velikog broja izolata, izostanka sporulacije u kulturama pri uobičajenim uvjetima te nemogućnosti razvrstavanja u morfotipove na temelju vegetativnih značajki su se za potrebe analize rezultata svi izolati kategorizirali samo kao gljivama slični organizmi, odnosno navode se kao *Pythium/Phytopythium* spp.

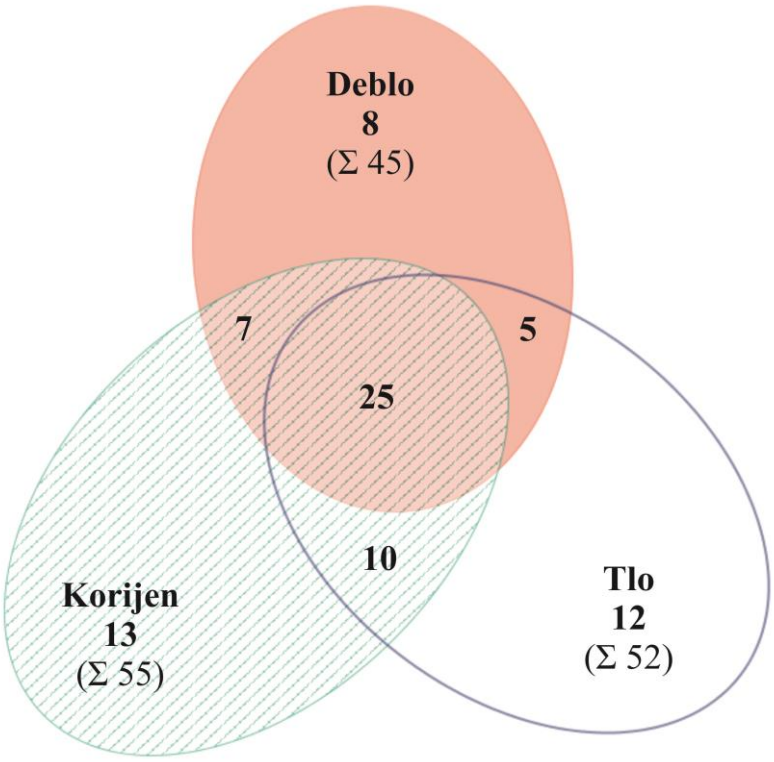
3.1.5 Distribucija identificiranih taksona s obzirom na kategoriju uzorka

Na uzorcima debla je zabilježen rast 324 (21,64 %) izolata svrstanih u 45 taksona, na uzorcima korijena 583 (38,95 %) izolata koji spadaju u 55 različitih taksona, a na uzorcima tla 590 (39,41 %) izolata koji su potom svrstani u 52 taksona (Prilog 3). Pritom krivulja akumulacije vrsta (taksona) ne doseže asimptotsku vrijednost niti za jednu kategoriju uzorka ukazujući na visoku raznolikost te mogućnost pronalaska novih vrsta (taksona) povećanjem broja uzorkovanih stabala (Slika 19).



Slika 19. Krivulje akumulacije vrsta (taksona) prema kategorijama uzorka

Kvalitativni Sørensenovi indeksi sličnosti su srednjih vrijednosti, dok su oni kvantitativni relativno niskih vrijednosti (Tablica 17), upućujući na različitost zajednica gljiva i njima sličnih organizama nađenih u deblu, korijenu i tlu. Većina identificiranih taksona je utvrđena na samo jednoj od tri kategorije uzorka iz kojih je vršena izolacija dok je njih 25 nađeno na svim kategorijama (Slika 20, Tablica 18). Dok su taksoni koji pripadaju carstvu gljiva bili prisutni u svim kategorijama uzorka, gljivama slični organizmi su zabilježeni samo u tlu gdje su prevladavali u odnosu na sve ostale utvrđene taksone brojeći ukupno 161 izolat. Osim gljivama sličnih organizama, u tlu su se najbrojnijima pokazale vrste roda *Trichoderma* (104 izolata) te vrsta *Absidia* sp. (88 izolata). Iz uzoraka korijena su najučestalije izolirane *Ilyonectria robusta* (107 izolata), *Fusarium solani* (72 izolata) te ponovno *Trichoderma* spp. (61 izolat). Na uzorcima debla su u najvećem broju utvrđene vrste roda *Trichoderma* (73 izolata), koje su ujedno i najčešće izolirane vrste na svim kategorijama uzoraka, te vrste *Talaromyces ucrainicus* (33 izolata) i *Talaromyces verruculosus* (24 izolata).



Slika 20. Vennov dijagram zajedničkih i nedijeljenih taksona s obzirom na kategoriju uzorka

Tablica 17. Sørensenovi indeksi sličnosti s obzirom na kategoriju uzorka

	Deblo vs. Korijen	Deblo vs. Tlo	Korijen vs. Tlo
Sørensenov kvantitativni indeks sličnosti	0,43	0,39	0,32
Sørensenov kvalitativni indeks sličnosti	0,64	0,62	0,65

Tablica 18. Popis taksona koji su zabilježeni u samo jednoj od tri analizirane kategorije uzorka

Deblo	**Korijen**	**Tlo**
Coprinellus radians	*Cadophora* sp.	*Amauroascus albicans*
Hypoxylon perforatum	*Chaetosphaeriaceae* sp.	*Clonostachys candelabrum*
Lecanicillium lecanii	*Colletotrichum truncatum*	*Gongronella butleri*
Nectria flavoviridis	*Daldinia pyrenaica*	*Metacordyceps chlamydosporia*
Paraphaeosphaeria sporulosa	*Dimorphospora foliicola*	*Metarhizium marquandii*
Penicillium glabrum	*Fontanospora* sp.	*Mortierellomycotina* sp.
Pezicula sp.	*Gongronella* sp.	*Mucor* sp.
Talaromyces ucrainicus	*Leucostoma persoonii*	*Nectria canadensis*
	Neobulgaria sp.	*Penicillium simplicissimum*
	Pezicula ericae	*Purpureocillium lilacinum*
	Trametes versicolor	*Pythium/Phytopythium* spp.
	Verticillium leptobactrum	*Westerdykella purpurea*
	Xylaria primorskensis	

Legenda:

parazit	endofit	saprotrof	NP (nije poznato)

Tablica 19. Popis taksona koji su zabilježeni u dvije od tri analizirane kategorije uzorka

Deblo i korijen	**Deblo i Tlo**	**Korijen i tlo**
Armillaria spp.	*Gibberella baccata*	*Chaetomium funicola*
Coprinellus micaceus	*Metapochonia bulbillosa*	*Dactylonectria vitis*
Hymenoscyphus fraxineus	*Penicillium atrosanguineum*	*Metarhizium robertsii*
Nemania serpens	*Pseudopithomyces chartarum*	*Microdiplodia* sp.
Pleosporales sp.	*Talaromyces verruculosus*	*Nemania* sp.
Podospora sp.		*Pezicula melanigena*
Xylaria polymorpha		*Psathyrella candolleana*
		Pseudogymnoascus sp.
		Talaromyces purpureogenus
		Tolypocladium cylindrosporum

Legenda:

parazit	endofit	saprotrof	NP (nije poznato)

Tablica 20. Popis taksona koji su zabilježeni u sve tri kategorije uzorka

Deblo, korijen i tlo		
Absidia sp.	*Epicoccum nigrum*	*Paraphaeosphaeria neglecta*
Acremonium murorum	*Fusarium solani*	*Penicillium ochrochloron*
Alternaria sp.	*Fusarium sporotrichioides*	*Penicillium* sp. 1
Aspergillus ruber	*Ganoderma adspersum*	*Penicillium* sp. 2
Beauveria bassiana	*Gibberella fujikuroi*	*Pholiota adiposa*
Cladosporium cladosporioides	*Ilyonectria robusta*	*Pseudeurotium bakeri*
Clonostachys rosea	*Neonectria punicea*	*Tolypocladium album*
Coprinellus disseminatus	*Neonectria* sp.	*Trichoderma* spp.
Diaporthe cotoneastri		

Legenda:

parazit	endofit	saprotrof	NP (nije poznato)

3.1.6 Distribucija identificiranih taksona s obzirom na kategoriju zdravstvenog stanja stabala

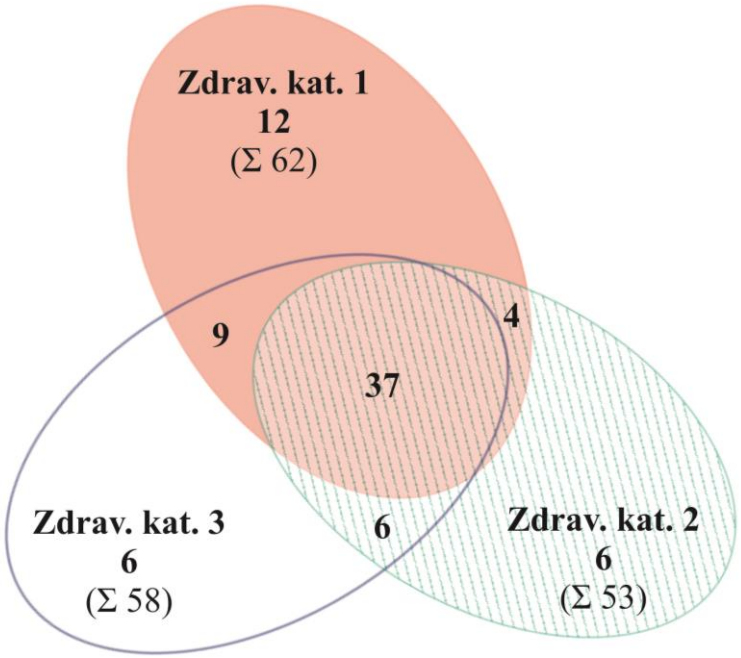
Na stablima zdravstvene kategorije 1 je ukupno dobiven 491 (32,80 %) izolat, odnosno 62 taksona gljiva i njima sličnih organizama, na stablima druge zdravstvene kategorije 483 (32,26 %) izolata svrstana u 53 taksona, a na stablima treće zdravstvene kategorije 523 (34,94 %) izolata koji spadaju u 58 različitih taksona (Prilog 3). Krivulje akumulacije vrsta (taksona) ne dosežu asimptotske vrijednosti što znači da bi povećanjem broja uzorkovanih stabala unutar svake kategorije zdravstvenog stanja bilo moguće otkriti još prisutnih taksona (Slika 21).

Slika 21. Krivulje akumulacije vrsta (taksona) prema kategorijama zdravstvenog stanja stabala

Relativno visoke vrijednosti kvantitativnh i kvalitativnih Sørensenovih indeksa sličnosti između pojedinih kategorija zdravstvenog stanja stabala ukazuju na veći broj taksona koji se javljaju podjednako u svim kategorijama (Tablica 21). Ukupno 37 taksona je zabilježeno u sve tri kategorije zdravstvenog stanja stabala, dok je njih 24 utvrđeno u samo jednoj kategoriji (Slika 22, Tablica 22 – 24). U zdravstvenoj kategoriji 1 je najveći broj dobivenih izolata pripadao gljivama sličnim organizmima (*Pythium*/*Phytopythium*, 62 izolata), zatim vrstama roda *Trichoderma* (61) te vrsti *Ilyonectria robusta* (42). U zdravstvenoj kategoriji 2 je najviše zabilježeno izolata roda *Trichoderma* (83), a po brojnosti su ih slijedili vrsta *Fusarium solani* (46) te taksonomska grupa *Pythium*/*Phytopythium* (40). U zdravstvenoj kategoriji 3 su ponovno najčešće izolirane vrste roda *Trichoderma* (94), potom vrste rodova *Pythium*/*Phytopythium* (59) i vrsta *Absidia* sp. (42).

Tablica 21. Sørensenovi indeksi sličnosti s obzirom na kategorije zdravstvenog stanja stabala

	Zdrav. kat. 1 vs. Zdrav. kat. 2	Zdrav. kat. 1 vs. Zdrav. kat. 3	Zdrav. kat. 2 vs. Zdrav. kat. 3
Sørensenov kvantitativni indeks sličnosti	0,72	0,74	0,76
Sørensenov kvalitativni indeks sličnosti	0,71	0,77	0,77



Slika 22. Vennov dijagram zajedničkih i nedijeljenih taksona s obzirom na kategoriju zdravstvenog stanja

Tablica 22. Popis taksona koji su zabilježeni u samo jednoj od tri kategorije zdravstvenog stanja stabala

Zdravstvena kat. 1	**Zdravstvena kat. 2**	**Zdravstvena kat. 3**
Chaetosphaeriaceae sp.	*Colletotrichum truncatum*	*Clonostachys candelabrum*
Fontanospora sp.	*Leucostoma persoonii*	*Coprinellus radians*
Gongronella butleri	*Metacordyceps chlamydosporia*	*Daldinia pyrenaica*
Gongronella sp.	*Nectria canadensis*	*Nectria flavoviridis*
Hypoxylon perforatum	*Paraphaeosphaeria sporulosa*	*Neobulgaria* sp.
Metapochonia bulbillosa	*Pezicula ericae*	*Westerdykella purpurea*
Penicillium glabrum		
Penicillium simplicissimum		
Pezicula sp.		
Trametes versicolor		
Verticillium leptobactrum		
Xylaria primorskensis		

Legenda:

parazit	endofit	saprotrof	NP (nije poznato)

Tablica 23. Popis taksona koji su zabilježeni u dvije od tri kategorije zdravstvenog stanja stabala

Zdravstvena kat. 1 i 2	**Zdravstvena kat. 1 i 3**	**Zdravstvena kat. 2 i 3**
Metarhizium robertsii	*Cadophora* sp.	*Amauroascus albicans*
Penicillium sp. 2	*Gibberella baccata*	*Dimorphospora foliicola*
Pholiota adiposa	*Mortierellomycotina* sp.	*Lecanicillium lecanii*
Podospora sp.	*Nemania* sp.	*Microdiplodia* sp.
	Paraphaeosphaeria neglecta	*Pseudopithomyces chartarum*
	Pleosporales sp.	*Purpureocillium lilacinum*
	Pseudogymnoascus sp.	
	Tolypocladium album	
	Xylaria polymorpha	

Legenda:

parazit	endofit	saprotrof	NP (nije poznato)

Tablica 24. Taksoni koji su zabilježeni u sve tri kategorije zdravstvenog stanja stabala

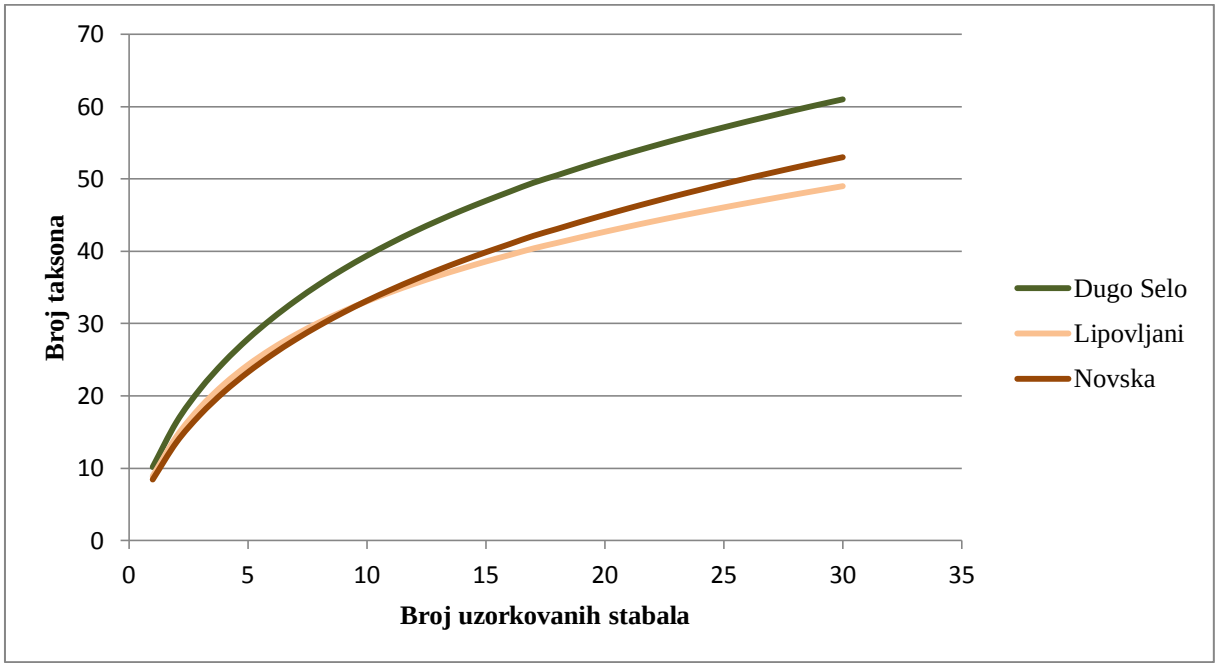
Zdravstvena kategorija 1,2 i 3		
Absidia sp.	*Epicoccum nigrum*	*Penicillium atrosanguineum*
Acremonium murorum	*Fusarium solani*	*Penicillium ochrochloron*
Alternaria sp.	*Fusarium sporotrichioides*	*Penicillium* sp. 1
Armillaria spp.	*Ganoderma adspersum*	*Pezicula melanigena*
Aspergillus ruber	*Gibberella fujikuroi*	*Psathyrella candolleana*
Beauveria bassiana	*Hymenoscyphus fraxineus*	*Pseudeurotium bakeri*
Chaetomium funicola	*Ilyonectria robusta*	*Pythium/Phytopythium* spp.
Cladosporium cladosporioides	*Metarhizium marquandii*	*Talaromyces purpureogenus*
Clonostachys rosea	*Mucor* sp.	*Talaromyces ucrainicus*
Coprinellus disseminatus	*Nemania serpens*	*Talaromyces verruculosus*
Coprinellus micaceus	*Neonectria punicea*	*Tolypocladium cylindrosporum*
Dactylonectria vitis	*Neonectria* sp.	*Trichoderma* spp.
Diaporthe cotoneastri		

Legenda:

parazit	endofit	saprotrof	NP (nije poznato)

3.1.7 Distribucija identificiranih taksona s obzirom na geografsku lokaciju uzorkovanja

Na stablima uzorkovanim u Dugom Selu je ukupno izolirano 515 (34,4 %) čistih kultura micelija gljiva i gljivama sličnih organizama svrstanih u 61 takson, dok je na stablima uzorkovanim u Lipovljanima te u Novskoj dobiven po 491 (32,8 %) izolat razvrstan u 49, odnosno u 53 taksona (Prilog 3). Niti jedna od krivulja akumulacije vrsta (taksona) nije dosegla asimptotsku vrijednost što ukazuje na mogućnost pronalaženja dodatnih taksona ukoliko bi se uzorkovao veći broj stabala na svakoj geografskoj lokaciji (Slika 23).

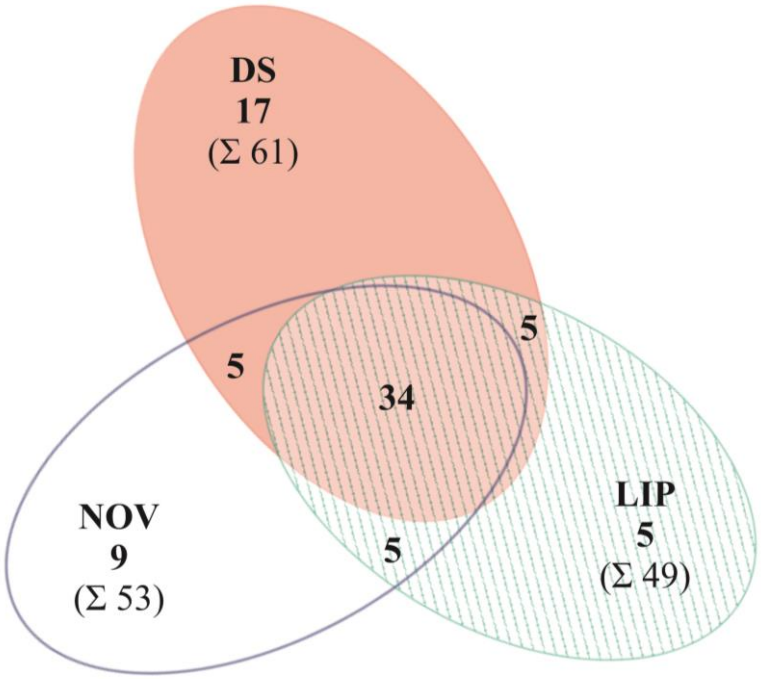


Slika 23. Krivulje akumulacije vrsta (taksona) prema geografskim lokacijama uzorkovanja

Kvalitativni i kvantitativni Sørensenovi indeksi sličnosti su pokazali relativno visoke vrijednosti upućujući na sličnost zajednica gljiva i gljivama sličnih organizama između geografskih lokacija uzorkovanja (Tablica 25). Na sve tri geografske lokacije su zabilježena 34 taksona dok je 31 takson utvrđen na samo jednoj od navedenih lokacija (Slika 24, Tablica 26 – 28). Osim vrsta roda *Trichoderma*, koje su bile najčešće izolirane na sve tri lokacije (DS = 57, LIP = 97, NOV = 84 izolata), u Dugom Selu i Lipovljanima su se najbrojnijima pokazali gljivama slični organizmi *Pythium*/*Phytopythium* (DS = 47, LIP = 57) te vrsta *Ilyonectria robusta* (DS = 46, LIP = 38). U Novskoj su također među najbrojnijim izolatima bili oni gljivama sličnih organizama (57), a slijedila ih je vrsta *Absidia* sp. (46).

Tablica 25. Sørensenovi indeksi sličnosti s obzirom na geografske lokacije uzorkovanja

	Dugo Selo vs. Lipovljani	Dugo Selo vs. Novska	Lipovljani vs. Novska
Sørensenov kvantitativni indeks sličnosti	0,68	0,69	0,71
Sørensenov kvalitativni indeks sličnosti	0,71	0,68	0,76



Slika 24. Vennov dijagram zajedničkih i nedijeljenih taksona s obzirom na geografsku lokaciju uzorkovanja

Tablica 26. Popis taksona koji su zabilježeni na samo jednoj od tri istraživane geografske lokacije

Dugo Selo	**Lipovljani**	**Novska**
Chaetomium funicola	*Coprinellus radians*	*Cadophora* sp.
Chaetosphaeriaceae sp.	*Neobulgaria* sp.	*Colletotrichum truncatum*
Dimorphospora foliicola	*Paraphaeosphaeria sporulosa*	*Daldinia pyrenaica*
Fontanospora sp.	*Pseudogymnoascus* sp.	*Leucostoma persoonii*
Gongronella sp.	*Trametes versicolor*	*Metacordyceps chlamydosporia*
Hypoxylon perforatum		*Nectria flavoviridis*t
Metapochonia bulbillosa		*Nemania* sp.
Nectria canadensis		*Pseudopithomyces chartarum*
Nemania serpens		*Xylaria primorskensis*
Penicillium glabrum		
Penicillium simplicissimum		
Pezicula ericae		
Pezicula sp.		
Pleosporales sp.		
Verticillium leptobactrum		
Westerdykella purpurea		
Xylaria polymorpha		

Legenda:

parazit	endofit	saprotrof	NP (nije poznato)

Tablica 27. Popis taksona koji su zabilježeni na dvije od tri istraživane lokacije

Dugo Selo i Lipovljani	**Dugo Selo i Novska**	**Lipovljani i Novska**
Hymenoscyphus fraxineus	*Armillaria* spp.	*Amauroascus albicans*
Mortierellomycotina sp.	*Clonostachys candelabrum*	*Coprinellus micaceus*
Penicillium atrosanguineum	*Coprinellus disseminatus*	*Gibberella baccata*
Penicillium sp. 2	*Lecanicillium lecanii*	*Gongronella butleri*
Podospora sp.	*Paraphaeosphaeria neglecta*	*Mucor* sp.

Legenda:

parazit	endofit	saprotrof	NP (nije poznato)

Tablica 28. Popis taksona koji su zabilježeni na sve tri istraživane geografske lokacije

Dugo Selo, Lipovljani, Novska		
Absidia sp.	*Ganoderma adspersum*	*Pholiota adiposa*
Acremonium murorum	*Gibberella fujikuroi*	*Psathyrella candolleana*
Alternaria sp.	*Ilyonectria robusta*	*Pseudeurotium bakeri*
Aspergillus ruber	*Metarhizium marquandii*	*Purpureocillium lilacinum*
Beauveria bassiana	*Metarhizium robertsii*	*Pythium/Phytopythium* spp.
Cladosporium cladosporioides	*Microdiplodia* sp.	*Talaromyces purpureogenus*
Clonostachys rosea	*Neonectria punicea*	*Talaromyces ucrainicus*
Dactylonectria vitis	*Neonectria* sp.	*Talaromyces verruculosus*
Diaporthe cotoneastri	*Penicillium ochrochloron*	*Tolypocladium album*
Epicoccum nigrum	*Penicillium* sp. 1	*Tolypocladium cylindrosporum*
Fusarium solani	*Pezicula melanigena*	*Trichoderma* spp.
Fusarium sporotrichioides		

Legenda:

parazit	endofit	saprotrof	NP (nije poznato)

3.1.8 Raznolikost zajednica gljiva i njima sličnih organizama

Na svakoj su od geografskih lokacija obuhvaćenih istraživanjem izračunati Shannonov indeks raznolikosti vrsta (H) i indeks ujednačenosti brojnosti jedinki zabilježenih taksona (*Buzas and Gibson's Evenness Index*, E) za zajednice gljiva i njima sličnih organizama na različitim kategorijama uzorka (deblo, korijen, tlo) i zdravstvenog stanja stabala.

U GJ Črnovščak šumarije Dugo Selo je najveća raznolikost zabilježena na deblima stabala zdravstvene kategorije 1, dok najmanju raznolikost pokazuju debla stabala druge zdravstvene kategorije. Indeks ujednačenosti je srednjih do visokih vrijednosti u različitim zajednicama, s najvećom vrijednošću na deblima stabala zdravstvene kategorije 3, a najmanjom u tlu zdravstvene kategorije 1 (Tablica 29, Tablica 32). Primjenom Kruskal-Wallis testa nije utvrđena statistički značajna razlika u vrijednostima između različitih kategorija zdravstvenog stanja stabala niti za jedan od navedenih indeksa (E ($p = 0,837$), H ($p = 0,733$)).

U GJ Josip Kozarac šumarije Lipovljani je najveća raznolikost izmjerena za zajednice gljiva i njima sličnih organizama u tlu oko stabala zdravstvene kategorije 1, dok je najmanja vrijednost indeksa raznolikosti zabilježena na deblima stabala zdravstvene kategorije 3. Indeks ujednačenosti je pokazao najveću vrijednost na deblima stabala zdravstvene kategorije 1, a najmanju u tlu oko stabala iste zdravstvene kategorije (Tablica 30, Tablica 33). Kruskal-Wallis test je za oba indeksa pokazao kako nema statistički značajne razlike u vrijednostima između različitih kategorija zdravstvenog stanja stabala (E ($p = 0,837$), H ($p = 0,061$)).

U GJ Trstika šumarije Novska je najveća raznolikost utvrđena na korijenju stabala zdravstvene kategorije 2, dok je najmanju raznolikost pokazala zajednica zabilježena na deblima stabala zdravstvene kategorije 3. Najveća vrijednost indeksa ujednačenosti je zabilježena na deblima stabala zdravstvene kategorije 2, a najmanja na deblima zdravstvene kategorije 3 (Tablica 31, Tablica 34). Rezultati Kruskal-Wallis testa pokazuju kako nema statistički značajne razlike u vrijednostima oba indeksa između različitih kategorija zdravstvenog stanja (E ($p = 0,301$), H ($p = 0,491$)).

Tablica 29. Vrijednosti indeksa ujednačenosti i Shannonovog indeksa za zajednice gljiva i njima sličnih organizama na različitim kategorijama uzorka i zdravstvenog stanja stabala u GJ Črnovščak šumarije Dugo Selo

GJ Črnovščak Dugo Selo	Zdravstveno stanje 1			Zdravstveno stanje 2			Zdravstveno stanje 3		
	Deblo	Korijen	Tlo	Deblo	Korijen	Tlo	Deblo	Korijen	Tlo
Indeks ujednačenosti (E)	0,807	0,627	0,552	0,680	0,707	0,613	0,827	0,643	0,617
Shannonov indeks (H)	2,877	2,624	2,402	2,386	2,697	2,602	2,755	2,391	2,408

Tablica 30. Vrijednosti indeksa ujednačenosti i Shannonovog indeksa za zajednice gljiva i njima sličnih organizama na različitim kategorijama uzorka i zdravstvenog stanja stabala u GJ Josip Kozarac šumarije Lipovljani

GJ Josip Kozarac Lipovljani	Zdravstveno stanje 1			Zdravstveno stanje 2			Zdravstveno stanje 3		
	Deblo	Korijen	Tlo	Deblo	Korijen	Tlo	Deblo	Korijen	Tlo
Indeks ujednačenosti (E)	0,837	0,594	0,542	0,649	0,600	0,640	0,718	0,630	0,563
Shannonov indeks (H)	2,220	2,369	2,479	2,340	2,322	2,262	2,066	2,103	2,199

Tablica 31. Vrijednosti indeksa ujednačenosti i Shannonovog indeksa za zajednice gljiva i njima sličnih organizama na različitim kategorijama uzorka i zdravstvenog stanja stabala u GJ Trstika šumarije Novska

GJ Trstika Novska	Zdravstveno stanje 1			Zdravstveno stanje 2			Zdravstveno stanje 3		
	Deblo	Korijen	Tlo	Deblo	Korijen	Tlo	Deblo	Korijen	Tlo
Indeks ujednačenosti (E)	0,744	0,714	0,484	0,795	0,663	0,532	0,474	0,691	0,483
Shannonov indeks (H)	2,269	2,371	2,365	2,479	2,584	2,009	1,818	2,402	2,044

Tablica 32. Popis taksona zabilježenih u Dugom Selu prema kategoriji uzorka i zdravstvenog stanja stabala

	Zdravstvena kategorija 1	Zdravstvena kategorija 2	Zdravstvena kategorija 3
Deblo	*Hypoxylon perforatum* *Nemania serpens* *Neonectria punicea* *Penicillium glabrum* *Pezicula* sp. *Pseudeurotium bakeri* *Talaromyces ucrainicus* *Talaromyces verruculosus* *Xylaria polymorpha*	*Armillaria* spp. *Fusarium sporotrichioides* *Talaromyces ucrainicus* *Talaromyces verruculosus*	*Beauveria bassiana* *Ganoderma adspersum* *Lecanicillium lecanii* *Nemania serpens* *Neonectria punicea* *Penicillium* sp. 1 *Pseudeurotium bakeri* *Talaromyces ucrainicus* *Tolypocladium album*
Korijen	*Chaetosphaeriaceae* sp. *Fontanospora* sp. *Gongronella* sp. *Pezicula melanigena* *Pleosporales* sp. *Podospora* sp. *Psathyrella candolleana* *Verticillium leptobactrum*	*Coprinellus disseminatus* *Dimorphospora foliicola* *Nemania serpens* *Pezicula ericae* *Pezicula melanigena* *Psathyrella candolleana*	*Acremonium murorum* *Dactylonectria vitis* *Dimorphospora foliicola* *Ilyonectria robusta* *Pezicula melanigena* *Xylaria polymorpha*
Tlo	*Metarhizium robertsii* *Neonectria* sp. *Penicillium atrosanguineum* *Penicillium simplicissimum* *Pythium/Phytopythium* spp. *Talaromyces purpureogenus*	*Acremonium murorum* *Beauveria bassiana* *Epicoccum nigrum* *Hymenoscyphus fraxineus* *Metarhizium marquandii* *Nectria canadensis* *Penicillium* sp. 2 *Pholiota adiposa* *Purpureocillium lilacinum* *Pythium/Phytopythium* spp.	*Chaetomium funicola* *Clonostachys candelabrum* *Coprinellus disseminatus* *Metarhizium marquandii* *Mortierellomycotina* sp. *Psathyrella candolleana* *Pythium/Phytopythium* spp. *Tolypocladium cylindrosporum* *Westerdykella purpurea*
Deblo i korijen	*Alternaria* sp. *Beauveria bassiana* *Coprinellus disseminatus* *Diaporthe cotoneastri*	*Aspergillus ruber* *Cladosporium cladosporioides* *Diaporthe cotoneastri* *Ganoderma adspersum*	*Armillaria* spp. *Diaporthe cotoneastri* *Hymenoscyphus fraxineus* *Pleosporales* sp.
Deblo i tlo	*Absidia* sp. *Aspergillus ruber* *Metapochonia bulbillosa* *Penicillium ochrocloron*	*Absidia* sp. *Neonectria* sp. *Penicillium atrosanguineum*	*Absidia* sp. *Penicillium ochrocloron*
Korijen i tlo	*Chaetomium funicola* *Epicoccum nigrum* *Fusarium solani* *Gibberella fujikuroi* *Ilyonectria robusta*	*Chaetomium funicola* *Clonostachys rosea* *Gibberella fujikuroi* *Metarhizium robertsii* *Tolypocladium cylindrosporum*	*Fusarium sporotrichioides* *Gibberella fujikuroi* *Microdiplodia* sp.
Deblo, korijen i tlo	*Cladosporium cladosporioides* *Clonostachys rosea* *Fusarium sporotrichioides* *Paraphaeosphaeria neglecta* *Trichoderma* spp.	*Alternaria* sp. *Fusarium solani* *Ilyonectria robusta* *Penicillium ochrocloron* *Trichoderma* sp.	*Cladosporium cladosporioides* *Clonostachys rosea* *Fusarium solani* *Trichoderma* sp.

Crvenom bojom su označeni taksoni kategorizirani kao paraziti.

Tablica 33. Popis taksona zabilježenih u Lipovljanima prema kategoriji uzorka i zdravstvenog stanja stabala

	Zdravstvena kategorija 1	**Zdravstvena kategorija 2**	**Zdravstvena kategorija 3**
Deblo	*Gibberella fujikuroi* *Hymenoscyphus fraxineus* *Ilyonectria robusta* *Penicillium* sp. 1 *Pezicula melanigena* *Talaromyces ucrainicus* *Talaromyces verruculosus*	*Beauveria bassiana* *Paraphaeosphaeria sporulosa* *Podospora* sp. *Talaromyces ucrainicus* *Talaromyces verruculosus*	*Coprinellus radians* *Penicillium atrosanguineum* *Talaromyces ucrainicus* *Talaromyces verruculosus*
Korijen	*Coprinellus micaceus* *Fusarium solani* *Fusarium sporotrichioides* *Penicillium* sp. 2 *Pseudogymnoascus* sp. *Tolypocladium album* *Trametes versicolor*	*Cladosporium cladosporioides* *Coprinellus micaceus* *Diaporthe cotoneastri* *Hymenoscyphus fraxineus* *Ilyonectria robusta* *Neonectria punicea* *Neonectria* sp. *Pezicula melanigena*	*Cladosporium cladosporioides* *Diaporthe cotoneastri* *Fusarium solani* *Neobulgaria* sp. *Neonectria punicea*
Tlo	*Acremonium murorum* *Dactylonectria vitis* *Gibberella baccata* *Gongronella butleri* *Metarhizium marquandii* *Metarhizium robertsii* *Mortierellomycotina* sp. *Neonectria punicea* *Pholiota adiposa* *Pseudeurotium bakeri* *Pythium/Phytopythium* spp. *Talaromyces purpureogenus* *Tolypocladium cylindrosporum*	*Acremonium murorum* *Gibberella fujikuroi* *Microdiplodia* sp. *Mucor* sp. *Psathyrella candolleana* *Pythium/Phytopythium* spp.	*Amauroascus albicans* *Aspergillus ruber* *Mucor* sp. *Pseudogymnoascus* sp. *Purpureocillium lilacinum* *Pythium/Phytopythium* spp. *Tolypocladium cylindrosporum*
Deblo i korijen	*Diaporthe cotoneastri*	*Clonostachys rosea* *Fusarium solani* *Ganoderma adspersum* *Penicillium* sp.1	*Coprinellus micaceus* *Ganoderma adspersum*
Deblo i tlo	*Penicillium ochrocloron*	*Penicillium atrosanguineum* *Penicillium ochrocloron* *Penicillium* sp. 2 *Pholiota adiposa*	*Acremonium murorum* *Penicillium* sp. 1 *Pseudeurotium bakeri*
Korijen i tlo	*Absidia* sp. *Aspergillus ruber* *Clonostachys rosea* *Ganoderma adspersum*	*Pseudeurotium bakeri* *Tolypocladium cylindrosporum*	*Absidia* sp. *Clonostachys rosea* *Ilyonectria robusta* *Penicillium ochrocloron*
Deblo, korijen i tlo	*Alternaria* sp. *Cladosporium cladosporioides* *Epicoccum nigrum* *Trichoderma* spp.	*Absidia* sp. *Epicoccum nigrum* *Trichoderma* spp.	*Alternaria* sp. *Trichoderma* spp.

Crvenom bojom su označeni taksoni kategorizirani kao paraziti.

Tablica 34. Popis taksona zabilježenih u Novskoj prema kategoriji uzorka i zdravstvenog stanja stabala

	Zdravstvena kategorija 1	**Zdravstvena kategorija 2**	**Zdravstvena kategorija 3**
Deblo	*Alternaria* sp. *Gibberella fujikuroi* *Talaromyces ucrainicus*	*Aspergillus ruber* *Fusarium sporotrichioides* *Lecanicillium lecanii* *Penicillium* sp. 1 *Talaromyces ucrainicus*	*Aspergillus ruber* *Epicoccum nigrum* *Fusarium sporotrichioides* *Gibberella baccata* *Nectria flavoviridis* *Paraphaeosphaeria neglecta*
Korijen	*Armillaria* spp. *Cadophora* sp. *Coprinellus micaceus* *Nemania* sp. *Pezicula melanigena* *Psathyrella candolleana* *Xylaria primorskensis*	*Clonostachys rosea* *Colletotrichum truncatum* *Coprinellus disseminatus* *Dactylonectria vitis* *Diaporthe cotoneastri* *Leucostoma personii* *Microdiplodia* sp. *Pholiota adiposa* *Psathyrella candolleana*	*Cadophora* sp. *Dactylonectria vitis* *Daldinia pyrenaica* *Ilyonectria robusta* *Neonectria punicea* *Neonectria* sp. *Pezicula melanigena* *Talaromyces purpureogenus*
Tlo	*Acremonium murorum* *Gongronella butleri* *Metarhizium marquandii* *Metarhizium robertsii* *Mucor* sp. *Pholiota adiposa* *Pythium/Phytopythium* spp. *Talaromyces purpureogenus* *Tolypocladium cylindrosporum*	*Amauroascus albicans* *Ganoderma adspersum* *Metacordyceps chlamydosporia* *Pseudopithomyces chartarum* *Pythium/Phytopythium* spp. *Talaromyces purpureogenus*	*Acremonium murorum* *Alternaria* sp. *Clonostachys candelabrum* *Clonostachys rosea* *Ganoderma adspersum* *Purpureocillium lilacinum* *Pythium/Phytopythium* spp. *Tolypocladium album* *Tolypocladium cylindrosporum*
Deblo i korijen	*Cladosporium cladosporioides*	*Armillaria* spp. *Cladosporium cladosporioides* *Coprinellus micaceus* *Ilyonectria robusta*	*Armillaria* spp. *Coprinellus micaceus* *Diaporthe cotoneastri*
Deblo i tlo	*Aspergillus ruber* *Beauveria bassiana* *Coprinellus disseminatus* *Ganoderma adspersum* *Penicillium ochrocloron* *Talaromyces verruculosus*	*Talaromyces verruculosus*	*Penicillium ochrocloron* *Pseudopithomyces chartarum*
Korijen i tlo	*Absidia* sp. *Clonostachys rosea* *Fusarium solani* *Pseudeurotium bakeri*	*Acremonium murorum* *Pezicula melanigena*	*Fusarium solani* *Nemania* sp. *Pseudeurotium bakeri*
Deblo, korijen i tlo	*Diaporthe cotoneastri* *Ilyonectria robusta* *Trichoderma* spp.	*Absidia* sp. *Fusarium solani* *Gibberella fujikuroi* *Penicillium ochrocloron* *Trichoderma* spp.	*Absidia* sp. *Trichoderma* spp.

Crvenom bojom su označeni taksoni kategorizirani kao paraziti.

3.1.9 Analiza utjecaja identificiranih taksona na zdravstveno stanje stabala

Za provjeru utjecaja identificiranih taksona na zdravstveno stanje stabala su postavljene sljedeće hipoteze:

H_0 = Distribucija taksona *n* je jednaka u svim kategorijama zdravstvenog stanja stabala.

H_a = Distribucija taksona *n* nije jednaka u svim kategorijama zdravstvenog stanja stabala.

Za testiranje hipoteza je korišten Fisherov egzaktni test a utvrđeni taksoni su testirani zasebno za svaku kategoriju uzorka (deblo, korijen, tlo), pri čemu se u obzir uzimao broj izolata samo onih taksona koji su u pojedinoj kategoriji utvrđeni na najmanje tri stabla.

Statistički značajna razlika u distribuciji je utvrđena za taksone *Armillaria* spp. i *Coprinellus disseminatus* na deblima stabala različitog zdravstvenog stanja, te za takson *Cladosporium cladosporioides* u okolnom tlu stabala različitog zdravstvenog stanja (Tablica 35).

Tablica 35. Izračunate p vrijednosti primjenom Fisherovog egzaktnog testa za taksone identificirane na deblu, korijenu i okolnom tlu s obzirom na kategoriju zdravstvenog stanja stabala

Identificirani takson DEBLO	p vrijednost	Identificirani takson KORIJEN	p vrijednost	Identificirani takson TLO	p vrijednost
Ilyonectria robusta	0,3182	*Ilyonectria robusta*	0,8933	*Ilyonectria robusta*	0,6125
Absidia sp.	0,4304	*Pezicula melanigena*	0,3953	*Absidia* sp.	0,8023
Gibberella fujikuroi	0,7702	*Absidia* sp.	1,0000	*Tolypocladium cylindrosporum*	0,7654
Diaporthe cotoneastri	0,2803	*Gibberella fujikuroi*	0,6125	*Gibberella fujikuroi*	0,2838
Neonectria punicea	0,7702	*Psathyrella candolleana*	0,1062	*Mortierellomycotina* sp.	0,7702
Clonostachys rosea	1,0000	*Diaporthe cotoneastri*	0,1270	*Clonostachys rosea*	1,0000
Epicoccum nigrum	1,0000	*Neonectria punicea*	0,1220	*Epicoccum nigrum*	0,5403
Cladosporium cladosporioides	0,1807	*Clonostachys rosea*	0,5403	*Cladosporium cladosporioides*	**0,0105**
Penicillium ochrochloron	0,2838	*Epicoccum nigrum*	0,3182	*Penicillium ochrochloron*	0,7586
Beauveria bassiana	0,6125	*Cladosporium cladosporioides*	0,5364	*Purpureocillium lilacinum*	0,1220
Hymenoscyphus fraxineus	1,0000	*Penicillium ochrochloron*	0,3922	*Beauveria bassiana*	0,3258
Armillaria spp.	**0,0327**	*Acremonium murorum*	0,7702	*Metarhizium marquandii*	0,3182
Pseudeurotium bakeri	0,4083	*Hymenoscyphus fraxineus*	0,0839	*Acremonium murorum*	0,9052
Ganoderma adspersum	0,4254	*Armillaria* spp.	0,2664	*Metarhizium robertsii*	0,3182

Nastavak – Tablica 35. Izračunate p vrijednosti primjenom Fisherovog egzaktnog testa za taksone identificirane na deblu, korijenu i okolnom tlu s obzirom na kategoriju zdravstvenog stanja stabala

Identificirani takson DEBLO	p vrijednost	Identificirani takson KORIJEN	p vrijednost	Identificirani takson TLO	p vrijednost
Fusarium solani	0,0736	*Pseudeurotium bakeri*	0,7702	*Pseudeurotium bakeri*	0,6799
Fusarium sporotrichioides	1,0000	*Ganoderma adspersum*	0,8678	*Ganoderma adspersum*	1,0000
Penicillium sp. 1	0,6915	*Fusarium solani*	0,4425	*Fusarium solani*	0,8031
Aspergillus ruber	0,6900	*Fusarium sporotrichioides*	0,3631	*Pholiota adiposa*	0,1179
Talaromyces ucrainicus	0,6687	*Chaetomium funicola*	0,7702	*Fusarium sporotrichioides*	0,7702
Talaromyces verruculosus	0,3927	*Coprinellus disseminatus*	0,7702	*Talaromyces purpureogenus*	0,3182
Penicillium atrosanguineum	0,1037	*Coprinellus micaceus*	0,7386	*Chaetomium funicola*	1,0000
Coprinellus disseminatus	**0,0322**	*Dactylonectria vitis*	0,7702	*Aspergillus ruber*	0,3182
Coprinellus micaceus	0,7702	*Nemania* sp.	0,7702	*Penicillium* sp. 2	0,1037
Nemania serpens	0,6170	*Alternaria* sp.	1,0000	*Penicillium atrosanguineum*	0,7702
Alternaria sp.	0,1460	*Trichoderma* spp.	0,3780	*Alternaria* sp.	1,0000
Trichoderma spp.	0,2548	-	-	*Trichoderma* spp.	0,8101
-	-	-	-	*Mucor* sp.	1,0000
-	-	-	-	*Pythium/Phytopythium* spp.	0,4075

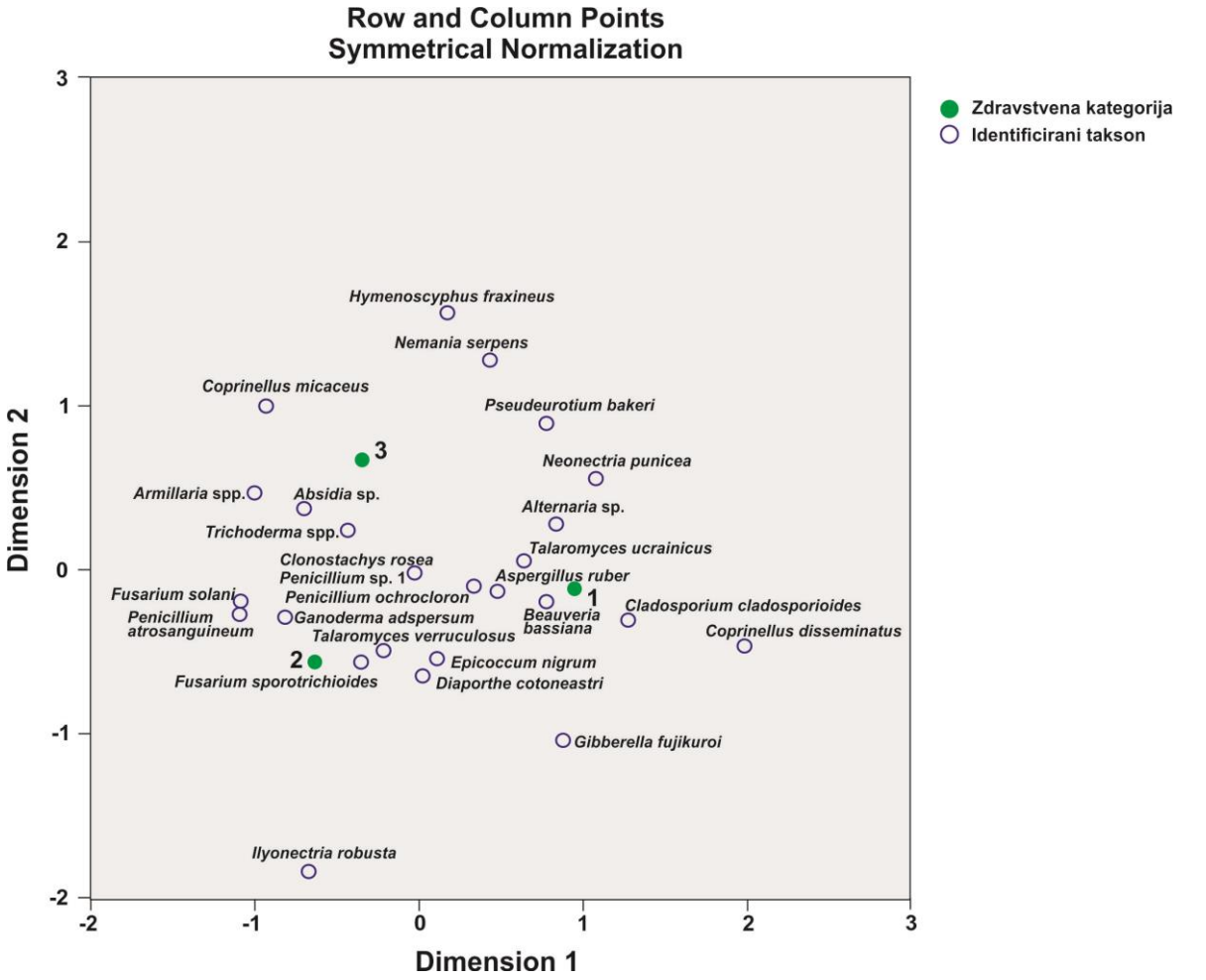
Legenda:

paraziti	endofit	saprotrof	NP (nije poznato)

Armillaria spp. pridolazi isključivo na deblima stabala druge i treće zdravstvene kategorije s jednim do dva izolata po stablu, dok je *Coprinellus disseminatus* zabilježen samo na deblima stabala prve zdravstvene kategorije s jednim izolatom po stablu (Tablica 36).

Tablica 36. Broj stabala u svakoj od kategorija zdravstvenog stanja na kojima se takson javlja prema opaženim frekvencijama (broju izolata) za *Armillaria* spp. i *Coprinellus disseminatus*

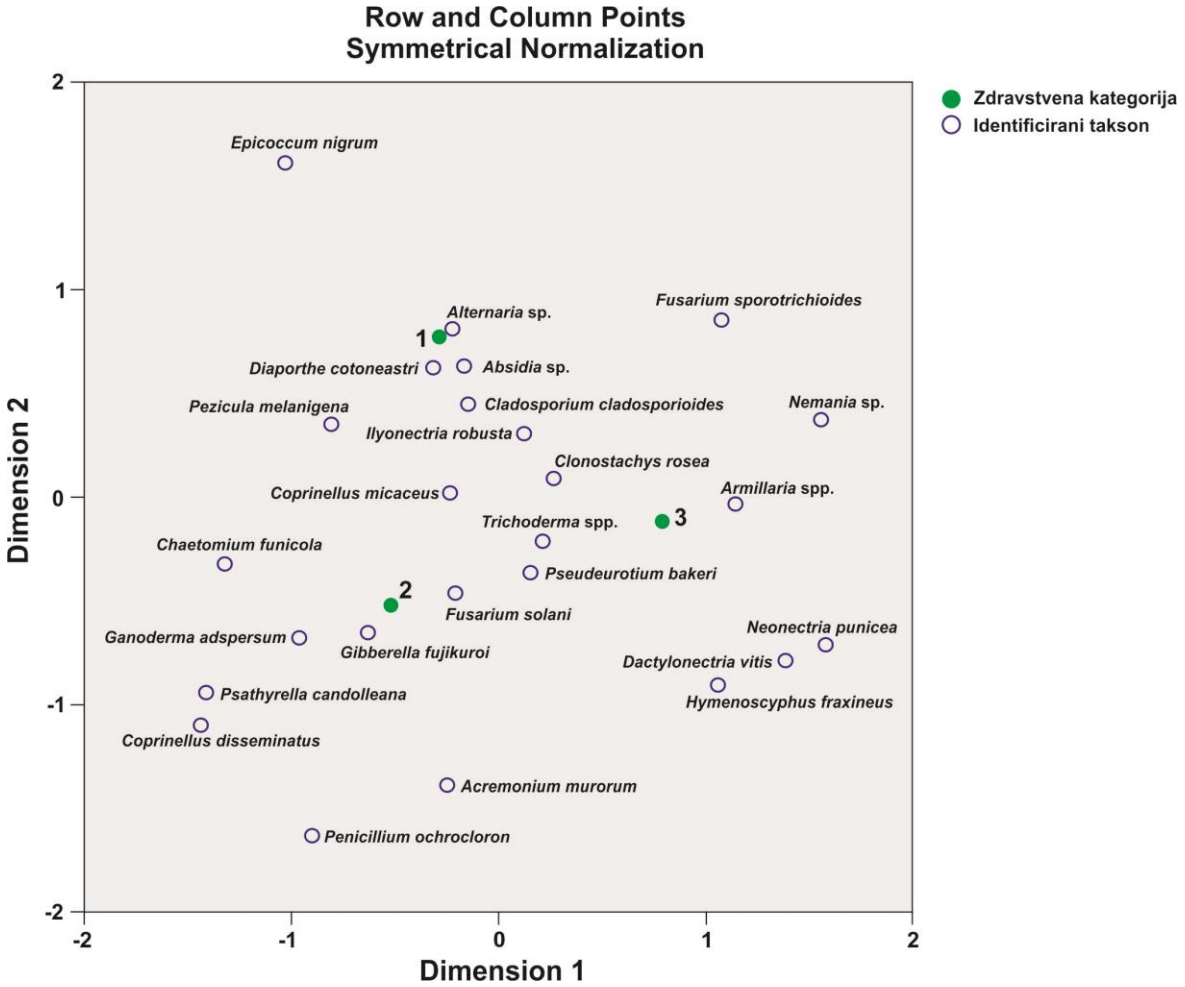
Opažena frekvencija *Armillaria* spp.	1	2	Opažena frekvencija *Coprinellus disseminatus*	1
	Broj stabala s opaženom frekvencijom			Broj stabala s opaženom frekvencijom
Zdrav. kat. 1	0	0	Zdrav. kat. 1	4
Zdrav. kat. 2	4	0	Zdrav. kat. 2	0
Zdrav. kat. 3	1	2	Zdrav. kat. 3	0



Slika 25. Grafički prikaz relativne povezanosti utvrđenih taksona gljiva na deblu s kategorijama zdravstvenog stanja stabala pomoću analize korespondencije

Analiza korespondencije također pokazuje relativno veću povezanost taksona *Armillaria* spp. na deblu sa stablima druge i treće zdravstvene kategorije, te dodatno i još nekih učestalijih i/ili parazitskih taksona poput *Fusarium solani* (sedam, odnosno pet izolata u drugoj te trećoj zdravstvenoj kategoriji, a niti jedan u prvoj), *Ganoderma adspersum* (jedan izolat u prvoj, šest u drugoj te četiri u trećoj zdrav. kategoriji) i *Trichoderma* spp. (14 izolata u prvoj, 27 u drugoj te 32 u trećoj zdrav. kat.), iako za njih nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji. Takson *Diaporthe cotoneastri* relativno češće pridolazi na deblima stabala zdravstvenih kategorija 1 i 2. Vidljiva je i relativno veća povezanost taksona *Coprinellus disseminatus* i *Cladosporium cladosporioides* s deblima stabala prve zdravstvene kategorije u odnosu na preostale dvije (Slika 25). Zabilježen je jedan izolat taksona *Hymenoscyphus fraxineus* na deblu stabla zdravstvene kategorije 1 te dva izolata na deblu zdravstvene kategorije 3 (Prilog 3).

Niti za jedan takson na korijenju stabala nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji između različitih zdravstvenih kategorija, iako je na grafičkom prikazu vidljiva relativno veća povezanost određenih taksona s nekom od zdravstvenih kategorija u odnosu na preostale dvije. Tako od učestalijih i/ili parazitskih taksona, *Armillaria* spp. i *Hymenoscyphus fraxineus* relativno češće pridolaze na korijenu stabala treće zdravstvene kategorije, *Fusarium solani* i *Ganoderma adspersum* na korijenu stabala u drugoj te *Diaporthe cotoneastri* u prvoj zdravstvenoj kategoriji (Slika 26, Prilog 3).



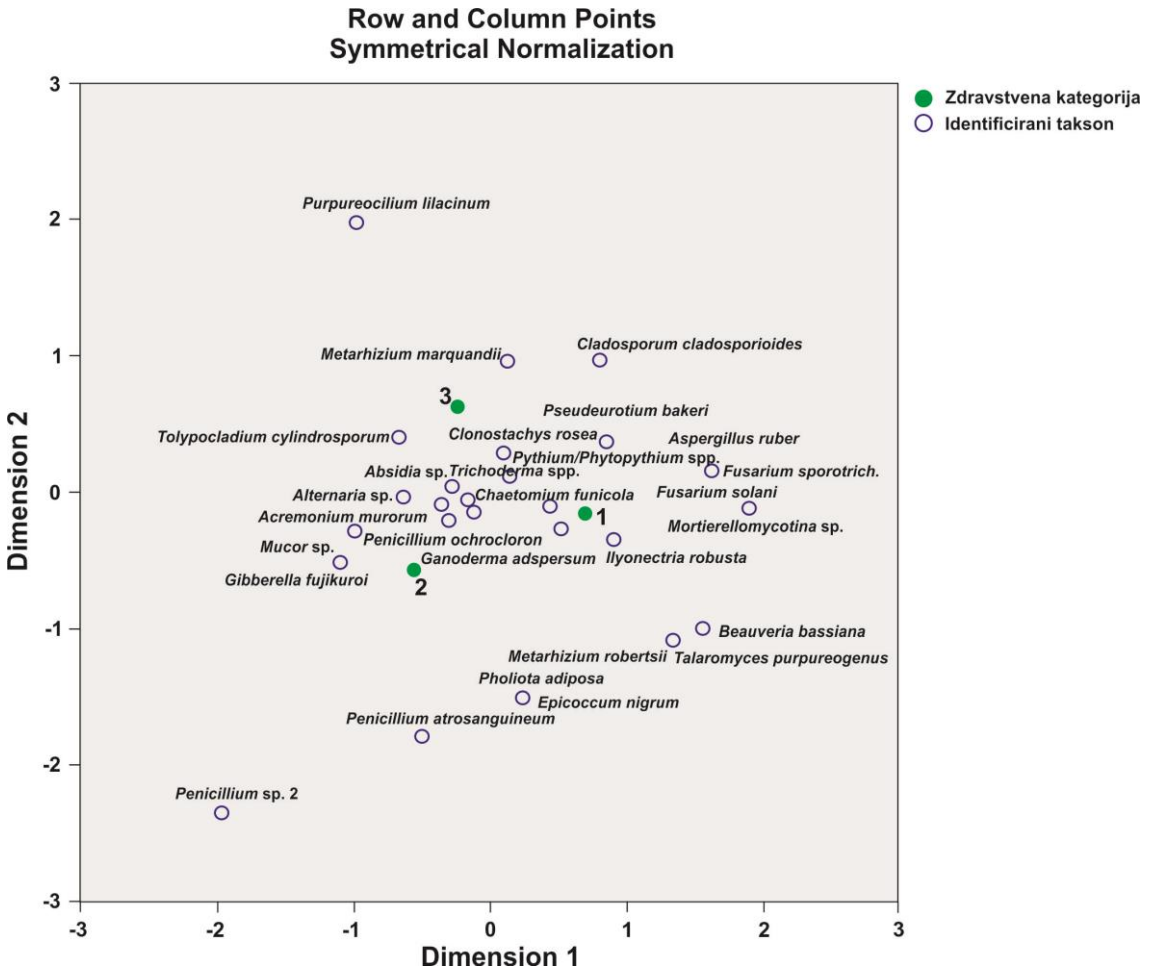
Slika 26. Grafički prikaz relativne povezanosti utvrđenih taksona gljiva na korijenu s kategorijama zdravstvenog stanja stabala pomoću analize korespondencije

Statistički značajna razlika u distribuciji taksona *Cladosporium cladosporioides* u okolnom tlu stabala u različitim kategorijama zdravstvenog stanja proizlazi iz odsutnosti taksona u drugoj zdravstvenoj kategoriji (Tablica 37). Analiza korespondencije isto tako pokazuje relativno veću udaljenost taksona *Cladosporium cladosporioides* i druge zdravstvene kategorije u odnosu na prvu i treću. Od učestalijih i/ili parazitskih taksona, *Ganoderma adspersum* i *Fusarium solani* relativno češće pridolaze u tlu oko stabala prve zdravstvene kategorije, prva sa svega dva izolata u odnosu na po jedan izolat zabilježen u okolnom tlu

stabala preostale dvije kategorije zdravstvenog stanja, dok potonja s osam izolata u prvoj, četiri u drugoj te pet u trećoj zdravstvenoj kategoriji. Taksoni *Armillaria* spp. i *Hymenoscyphus fraxineus* nisu utvrđeni u tlu, dok je za *Diaporthe cotoneastri* zabilježen samo jedan izolat u tlu oko stabla zdravstvene kategorije 1, stoga nisu vidljivi na grafičkom prikazu analize korespondencije (Slika 27, Prilog 3).

Tablica 37. Broj stabala u svakoj od kategorija zdravstvenog stanja na kojima se takson javlja prema opaženim frekvencijama (broju izolata) za *Cladosporium cladosporioides*

Opažena frekvencija *Cladosporium cladosporioides*	1	2
	Broj stabala s opaženom frekvencijom	
Zdrav. kat. 1	4	0
Zdrav. kat. 2	0	0
Zdrav. kat. 3	0	2

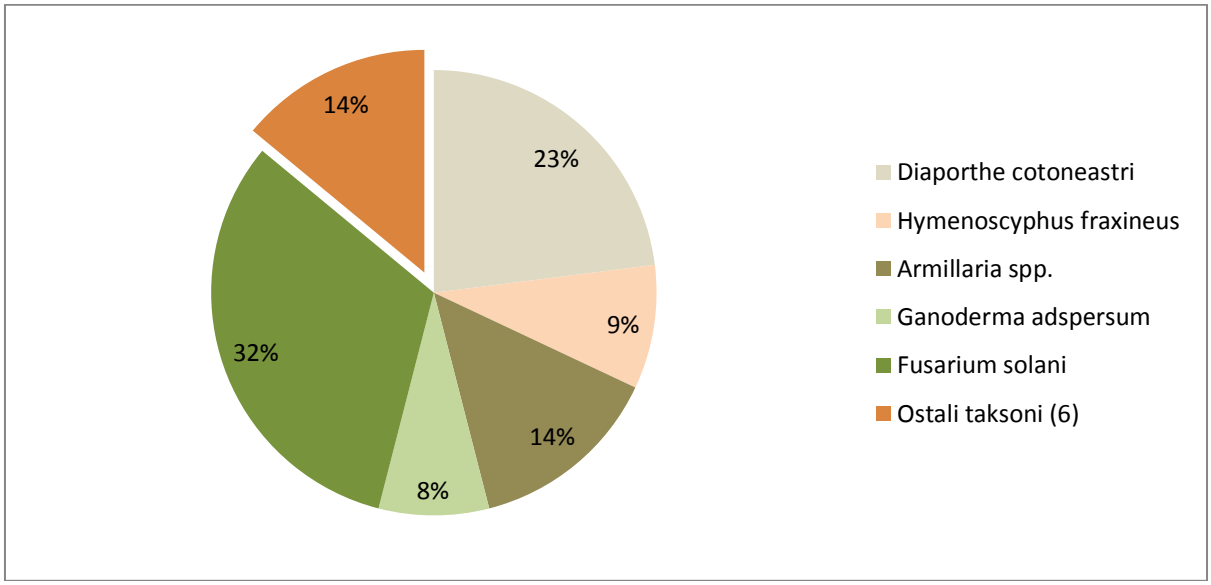


Slika 27. Grafički prikaz relativne povezanosti utvrđenih taksona gljiva i gljivama sličnih organizama u tlu s kategorijama zdravstvenog stanja stabala pomoću analize korespondencije

3.1.10 Analiza povezanosti identificiranih taksona prisutnih u biljnom tkivu (korijen, deblo) sa zdravstvenim stanjem stabala

Od 12 taksona identificiranih u ovom istraživanju koji su kategorizirani kao paraziti, njih 11 je utvrđeno u biljnom tkivu korijena i baze debla poljskoga jasena s ukupno 257 izolata, pri čemu je u zdravstvenoj kategoriji 1 zabilježen 61 izolat, u zdravstvenoj kategoriji 2 njih 103, a u zdravstvenoj kategoriji 3 ukupno 93 izolata. Pritom 86 % izolata spada u pet dominantnih taksona, dok je preostalih šest taksona predstavljeno sa svega 14 % ukupnog broja izolata koji pripadaju parazitima (Slika 28). Od pet dominantnih taksona, broj utvrđenih izolata *Hymenoscyphus fraxineus* i *Armillaria* spp. u biljnom tkivu raste pogoršanjem zdravstvenog stanja stabala, broj izolata taksona *Fusarium solani* i *Ganoderma adspersum* je najveći u zdravstvenoj kategoriji 2, dok se broj izolata taksona *Diaporthe cotoneastri* smanjuje pogoršanjem zdravstvenog stanja stabala (Tablica 38).

U istraživanju je u biljnom tkivu poljskoga jasena zabilježeno 18 taksona kategoriziranih kao saprotrofi s ukupno 222 izolata. Od toga je u prvoj zdravstvenoj kategoriji utvrđeno 59 izolata, u drugoj 83, a u trećoj 80. Broj izolata nekih od najčešće zabilježenih saprotrofnih taksona, kao što su *Absidia* sp. i *Trichoderma* spp., se povećava pogoršanjem zdravstvenog stanja stabala, dok je kod drugih, kao što su *Coprinellus micaceus* i *Psathyrella candolleana*, najveći u drugoj zdravstvenoj kategoriji (Tablica 39).



Slika 28. Udio izolata pojedinih taksona kategoriziranih kao paraziti u ukupnom broju izolata svih taksona kategoriziranih kao paraziti u korijenu i donjem dijelu debla (u biljnom tkivu) stabala poljskoga jasena

Tablica 38. Broj dobivenih izolata taksona kategoriziranih kao paraziti u biljnom tkivu (korijen, deblo) s obzirom na kategorije zdravstvenog stanja stabala

Takson	**Zdrav. kat. 1**	**Zdrav. kat. 2**	**Zdrav. kat. 3**
Armillaria spp.	5	8	22
Aspergillus ruber	5	4	2
Dactylonectria vitis	0	1	3
Diaporthe cotoneastri	26	20	13
Fusarium solani	15	42	27
Fusarium sporotrichioides	3	2	4
Ganoderma adspersum	3	12	5
Gibberella fujikuroi	3	4	1
Hymenoscyphus fraxineus	1	7	16
Leucostoma persoonii	0	1	0
Pholiota adiposa	0	2	0
Pythium/Phytopythium spp.	-	-	-

Tablica 39. Broj dobivenih izolata taksona kategoriziranih kao saprotrofi u biljnom tkivu (korijen, deblo) s obzirom na kategorije zdravstvenog stanja stabala

Takson	**Zdrav. kat. 1**	**Zdrav. kat. 2**	**Zdrav. kat. 3**
Absidia sp.	6	7	8
Coprinellus disseminatus	5	5	0
Coprinellus micaceus	8	11	9
Coprinellus radians	0	0	1
Dimorphospora foliicola	0	1	2
Gongronella sp.	1	0	0
Hypoxylon perforatum	1	0	0
Metapochonia bulbilosa	1	0	0
Paraphaeosphaeria neglecta	2	0	1
Paraphaeosphaeria sporulosa	0	1	0
Podospora sp.	1	1	0
Psathyrella candolleana	2	8	0
Pseudogymnoascus sp.	1	0	0
Talaromyces purpurogenus	0	0	1
Trametes versicolor	1	0	0
Trichoderma spp.	28	49	57
Xylaria polymorpha	1	0	1
Xylaria primorskensis	1	0	0

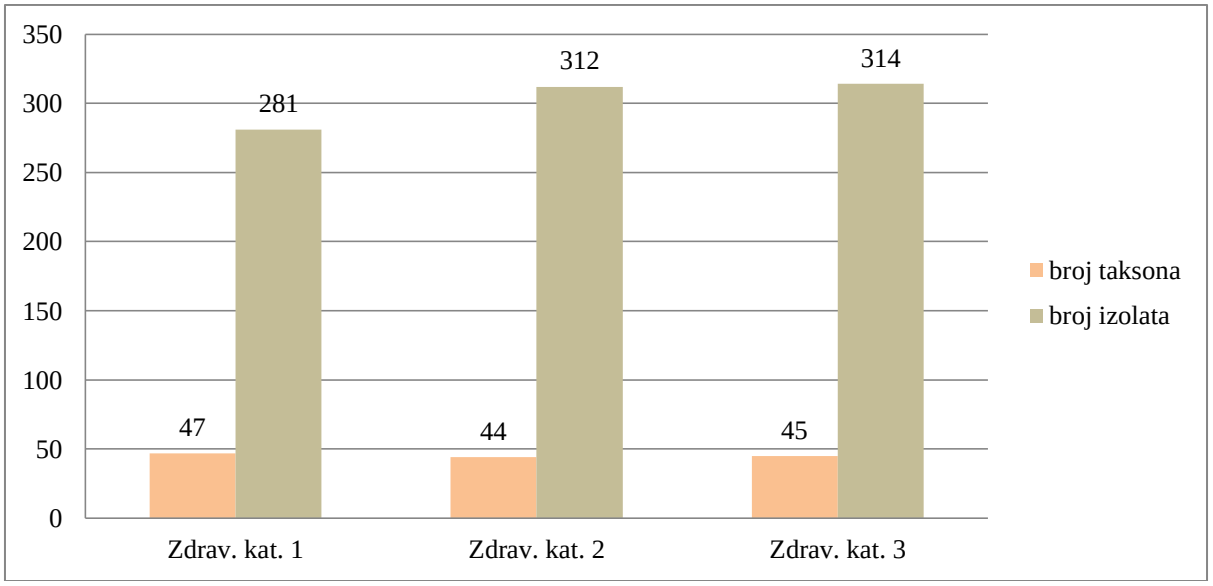
U ovom je istraživanju u biljnom tkivu poljskoga jasena utvrđeno 30 taksona kategoriziranih kao endofiti. Od ukupno 393 dobivena izolata, njih 153 je nađeno na stablima prve, 116 na stablima druge te 124 na stablima treće zdravstvene kategorije. Najčešće zabilježeni endofit je takson *Ilyonectria robusta*, čiji je broj izolata utvrđen u biljnom tkivu gotovo jednak u sve tri kategorije zdravstvenog stanja stabala. Za razliku od njega, broj izolata prisutnih u biljnom

tkivu drugog najčešće zabilježenog endofita, taksona *Cladosporium cladosporioides*, se smanjuje pogoršanjem zdravstvenog stanja stabala (Tablica 40).

Tablica 40. Broj dobivenih izolata taksona kategoriziranih kao endofiti u biljnom tkivu (korijen, deblo) s obzirom na kategorije zdravstvenog stanja stabala

Takson	**Zdrav. kat. 1**	**Zdrav. kat. 2**	**Zdrav. kat. 3**
Acremonium murorum	0	2	3
Alternaria sp.	8	2	4
Beauveria bassiana	4	1	1
Chaetomium funicola	1	2	0
Cladosporium cladosporioides	36	19	18
Clonostachys rosea	6	6	8
Colletotrichum truncatum	0	1	0
Epicoccum nigrum	5	3	1
Gibberella baccata	0	0	1
Ilyonectria robusta	39	34	39
Lecanicillium lecanii	0	1	1
Metarhizium robertsii	0	1	0
Microdiplodia sp.	0	1	4
Nectria flavoviridis	0	0	1
Nemania serpens	3	1	4
Nemania sp.	1	0	3
Neobulgaria sp.	0	0	2
Neonectria punicea	2	1	5
Penicillium glabrum	1	0	0
Penicillium ochrochloron	5	8	4
Pezicula ericae	0	1	0
Pezicula melanigena	8	8	2
Pezicula sp.	1	0	0
Pseudeurotium bakeri	6	2	6
Pseudopithomyces chartarum	0	0	1
Talaromyces ucrainicus	18	6	9
Talaromyces verruculosus	7	11	6
Tolypocladium album	1	0	1
Tolypocladium cylindrosporum	0	5	0
Verticillium leptobactrum	1	0	0

Ukupni broj taksona utvrđenih u biljnom tkivu poljskoga jasena (korijen i deblo), bez uzimanja u obzir kategorije načina života i ishrane kojoj pripadaju, neznatno pada pogoršanjem zdravstvenog stanja stabala, dok broj izolata raste (Slika 29).



Slika 29. Ukupni broj taksona i izolata zabilježenih u biljnom tkivu poljskoga jasena (deblo i korijen) prema kategorijama zdravstvenog stanja stabala

3.1.11 Analiza povezanosti identificiranih taksona s geografskim lokacijama uzorkovanja

Kako bi se utvrdilo postoje li razlike u pridolasku pojedinih taksona na različitim geografskim lokacijama obuhvaćenim istraživanjem, postavljene su sljedeće hipoteze:

H_0 = Distribucija taksona *n* je jednaka na svim geografskim lokacijama sakupljanja uzoraka.

H_a = Distribucija taksona *n* nije jednaka na svim geografskim lokacijama sakupljanja uzoraka.

Za testiranje hipoteza je korišten Fisherov egzaktni test a utvrđeni taksoni su testirani zasebno za svaku kategoriju uzorka (deblo, korijen, tlo), pri čemu se u obzir uzimao broj izolata samo onih taksona koji su u pojedinoj kategoriji utvrđeni na najmanje tri stabla.

Statistički značajna razlika u distribuciji je utvrđena za taksone *Diaporthe cotoneastri, Penicillium* sp. 1 te *Nemania serpens* na deblu, za taksone *Absidia* sp., *Cladosporium cladosporioides, Armillaria* spp., *Ganoderma adspersum, Coprinellus micaceus* te *Trichoderma* spp. na korijenovom sustavu, te za taksone *Gibberella fujikuroi* i *Fusarium solani* u okolnom tlu stabala različitih geografskih lokacija (Tablica 41).

Tablica 41. Izračunate p vrijednosti primjenom Fisherovog egzaktnog testa za taksone identificirane na deblu, korijenu i okolnom tlu s obzirom na geografsku lokaciju uzorkovanja

Identificirani takson DEBLO	p vrijednost	Identificirani takson KORIJEN	p vrijednost	Identificirani takson TLO	p vrijednost
Ilyonectria robusta	0,5403	*Ilyonectria robusta*	0,1286	*Ilyonectria robusta*	1,0000
Absidia sp.	0,1634	*Pezicula melanigena*	0,1335	*Absidia* sp.	0,8124
Gibberella fujikuroi	0,7702	*Absidia* sp.	**0,0229**	*Tolypocladium cylindrosporum*	0,1665
Diaporthe cotoneastri	**0,0467**	*Gibberella fujikuroi*	0,1220	*Gibberella fujikuroi*	**0,0169**
Neonectria punicea	0,1037	*Psathyrella candolleana*	0,6936	*Mortierellomycotina* sp.	0,7702
Clonostachys rosea	0,7702	*Diaporthe cotoneastri*	0,1349	*Clonostachys rosea*	0,1318
Epicoccum nigrum	0,1220	*Neonectria punicea*	0,3631	*Epicoccum nigrum*	0,5403
Cladosporium cladosporioides	0,6586	*Clonostachys rosea*	0,1756	*Cladosporium cladosporioides*	0,1714
Penicillium ochrochloron	0,7631	*Epicoccum nigrum*	0,3182	*Penicillium ochrochloron*	0,6450
Beauveria bassiana	0,6125	*Cladosporium cladosporioides*	**0,0200**	*Purpureocillium lilacinum*	0,6900
Hymenoscyphus fraxineus	1,0000	*Penicillium ochrochloron*	1,0000	*Beauveria bassiana*	0,3258
Armillaria spp.	0,0938	*Acremonium murorum*	0,7702	*Metarhizium marquandii*	1,0000
Pseudeurotium bakeri	0,0520	*Hymenoscyphus fraxineus*	0,4008	*Acremonium murorum*	0,1819
Ganoderma adspersum	0,1930	*Armillaria* spp.	**0,0058**	*Metarhizium robertsii*	1,0000
Fusarium solani	0,7654	*Pseudeurotium bakeri*	0,1037	*Pseudeurotium bakeri*	0,0938
Fusarium sporotrichioides	0,5403	*Ganoderma adspersum*	**0,0097**	*Ganoderma adspersum*	0,3182
Penicillium sp. 1	**0,0151**	*Fusarium solani*	0,1208	*Fusarium solani*	**0,0177**
Aspergillus ruber	0,2591	*Fusarium sporotrichioides*	0,1220	*Pholiota adiposa*	0,5213
Talaromyces ucrainicus	0,9235	*Chaetomium funicola*	0,1037	*Fusarium sporotrichioides*	0,1037
Talaromyces verruculosus	0,1020	*Coprinellus disseminatus*	0,3258	*Talaromyces purpureogenus*	1,0000
Penicillium atrosanguineum	0,5403	*Coprinellus micaceus*	**0,0016**	*Chaetomium funicola*	0,1037
Coprinellus disseminatus	0,3182	*Dactylonectria vitis*	0,3258	*Aspergillus ruber*	1,0000
Coprinellus micaceus	0,7702	*Nemania* sp.	0,1037	*Penicillium* sp. 2	0,7702
Nemania serpens	**0,0322**	*Alternaria* sp.	0,5403	*Penicillium atrosanguineum*	0,7702

Nastavak – Tablica 41. Izračunate p vrijednosti primjenom Fisherovog egzaktnog testa za taksone identificirane na deblu, korijenu i okolnom tlu s obzirom na geografsku lokaciju uzorkovanja

Identificirani takson DEBLO	p vrijednost	Identificirani takson KORIJEN	p vrijednost	Identificirani takson TLO	p vrijednost
Alternaria sp.	0,5918	*Trichoderma* spp.	**0,0079**	*Alternaria* sp.	1,0000
Trichoderma spp.	0,6672	-	-	*Trichoderma* spp.	0,9230
-	-	-	-	*Mucor* sp.	0,3922
-	-	-	-	*Pythium/Phytopythium* spp.	0,5972

Legenda:

parazit	endofit	saprotrof	NP (nije poznato)

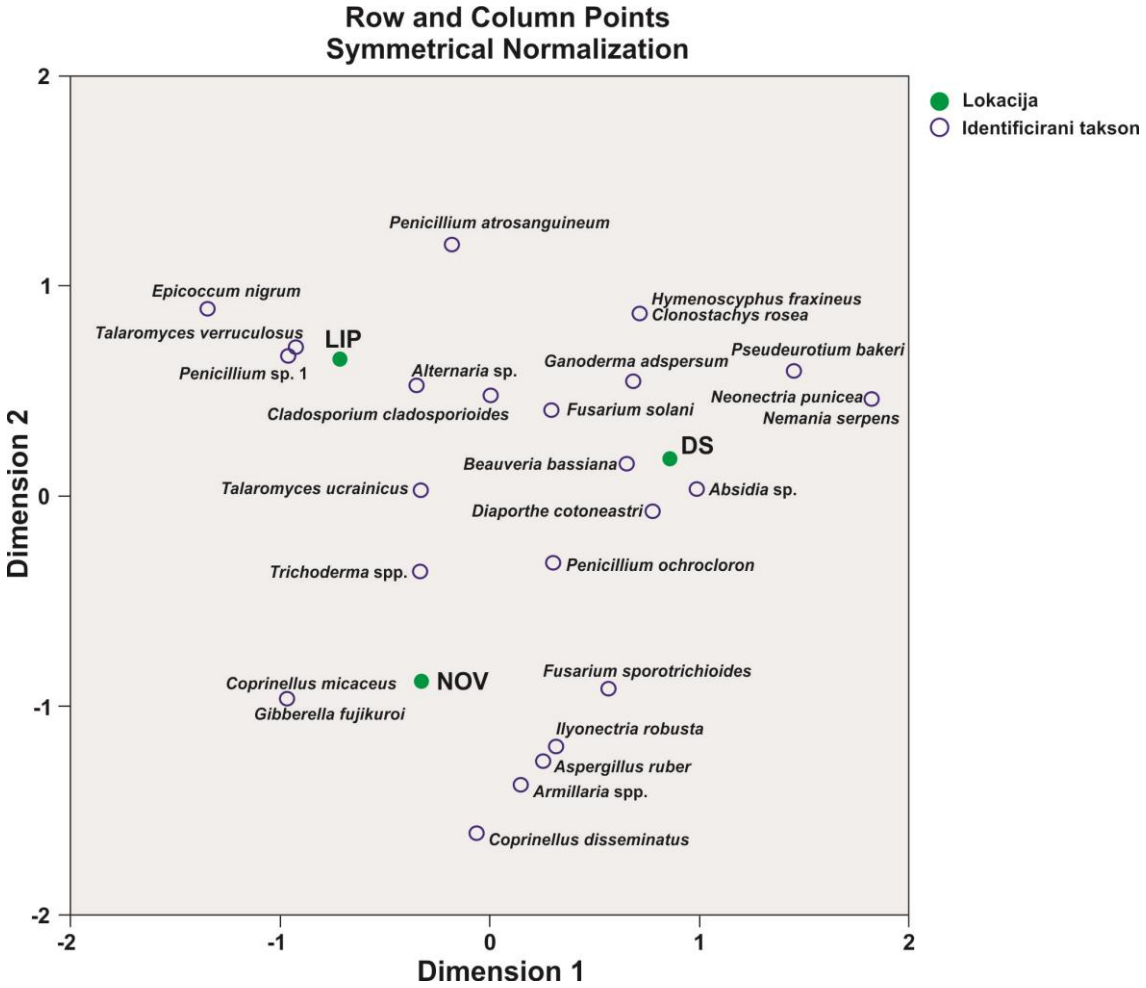
Takson *Diaporthe cotoneastri* je utvrđen u deblu stabala na sve tri istraživane geografske lokacije, pri čemu je u Dugom Selu zabilježen na najvećem broju stabala, dok je *Nemania serpens* utvrđen isključivo na deblu stabala na navedenoj lokaciji (Tablica 42). Takson *Penicillium* sp. 1 pridolazi na deblu većeg broja stabala u Lipovljanima u odnosu na ostale dvije lokacije (Tablica 43). Grafički prikaz relativne povezanosti taksona na deblu s geografskom lokacijom uzorkovanja potvrđuje češći pridolazak taksona za koje je dobivena statistički značajna razlika u distribuciji na prethodno navedenim lokacijama. Vidljiva je i relativno veća prisutnost taksona *Armillaria* spp. na deblima stabala u Novskoj, gdje je zabilježena na pet stabala u odnosu na dva stabla u Dugom Selu te niti jedno u Lipovljanima. *Ganoderma adspersum* relativno češće pridolazi na deblima stabala u Dugom Selu, gdje je zabilježeno sedam izolata, za razliku od njih tri u Lipovljanima te jednog u Novskoj. Vrsta *Fusarium solani* pokazuje relativno veću povezanost s lokacijama u Dugom Selom i Lipovljanima, gdje je utvrđeno šest, odnosno četiri izolata, u usporedbi s Novskom gdje su nađena dva. Dva, odnosno jedan izolat vrste *Hymenoscyphus fraxineus* su dobiveni iz debla po jednog stabla samo na lokacijama u Dugom Selu i Lipovljanima (Slika 30, Prilog 3).

Tablica 42. Broj stabala na svakoj od geografskih lokacija na kojima se takson javlja prema opaženim frekvencijama (broju izolata) za *Diaporthe cotoneastri* i *Nemania serpens*

Opažena frekvencija *Diaporthe cotoneastri*	1	2	Opažena frekvencija *Nemania serpens*	1	2	3
	Broj stabala s opaženom frekvencijom			Broj stabala s opaženom frekvencijom		
Dugo Selo	4	3	Dugo Selo	2	1	1
Lipovljani	0	1	Lipovljani	0	0	0
Novska	4	0	Novska	0	0	0

Tablica 43. Broj stabala na svakoj od geografskih lokacija na kojima se takson javlja prema opaženim frekvencijama (broju izolata) za *Penicillium* sp.1

Opažena frekvencija *Penicillium* sp. 1	1	2
	Broj stabala s opaženom frekvencijom	
Dugo Selo	1	0
Lipovljani	6	0
Novska	0	1



Slika 30. Grafički prikaz relativne povezanosti utvrđenih taksona gljiva na deblu s geografskim lokacijama uzorkovanja pomoću analize korespondencije

Od taksona za koje je utvrđena statistički značajna razlika na korijenu, *Trichoderma* spp. i *Cladosporium cladosporioides* pridolaze na svim obuhvaćenim lokacijama, ali su najbrojniji na stablima u Lipovljanima, iako je potonji prisutan na većem broju stabala u Dugom Selu no s manjim brojem izolata. Taksoni *Absidia* sp. i *Coprinellus micaceus* nisu zabilježeni u Dugom Selu dok na ostale dvije lokacije pridolaze na korijenju manjeg ili većeg broja stabala. Taksoni *Armillaria* sp. i *Ganoderma adspersum* su utvrđeni gotovo isključivo (s iznimkom jednog stabla) u Novskoj, odnosno potonji u Lipovljanima (Tablica 44 – 47). Analiza

korespondencije pokazuje relativno veću povezanost za ovdje nabrojane taksone s lokacijama na kojima su ukupno najbrojniji. Na grafičkom prikazu je, iako nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji, vidljiv relativno češći pridolazak *Hymenoscyphus fraxineus* na korijenju stabala u Dugom Selu (17 izolata na četiri stabala) u odnosu na lokaciju u Lipovljanima (četiri izolata na dva stabala) te u Novskoj (nije utvrđena). Isto tako je vidljiva relativno veća povezanost taksona *Diaporthe cotoneastri* i *Fusarium solani* s lokacijom u Novskoj, gdje je dobiveno 20 izolata taksona *Diaporthe cotoneastri* na 14 stabala u usporedbi s lokacijama u Dugom Selu i Lipovljanima gdje je zabilježeno 12 izolata na osam stabala, odnosno 11 izolata na sedam stabala. U Novskoj su utvrđena 34 izolata taksona *Fusarium solani* na korijenu 10 stabala, za razliku od Dugog Sela i Lipovljana gdje je zabilježeno 19 izolata na korijenu 10, odnosno 11 stabala (Slika 31, Prilog 3).

Tablica 44. Broj stabala na svakoj od geografskih lokacija na kojima se takson javlja prema opaženim frekvencijama (broju izolata) za *Absidia* sp. i *Cladosporium cladosporioides*

Opažena frekvencija *Absidia* sp.	1	2	Opažena frekvencija *Cladosporium cladosporioides*	1	2	3	4	5	7
	Broj stabala s opaženom frekvencijom			Broj stabala s opaženom frekvencijom					
Dugo Selo	0	0	Dugo Selo	10	3	0	0	0	0
Lipovljani	3	0	Lipovljani	3	1	4	1	0	1
Novska	6	1	Novska	4	0	1	0	1	0

Tablica 45. Broj stabala na svakoj od geografskih lokacija na kojima se takson javlja prema opaženim frekvencijama (broju izolata) za *Armillaria* spp. i *Ganoderma adspersum*

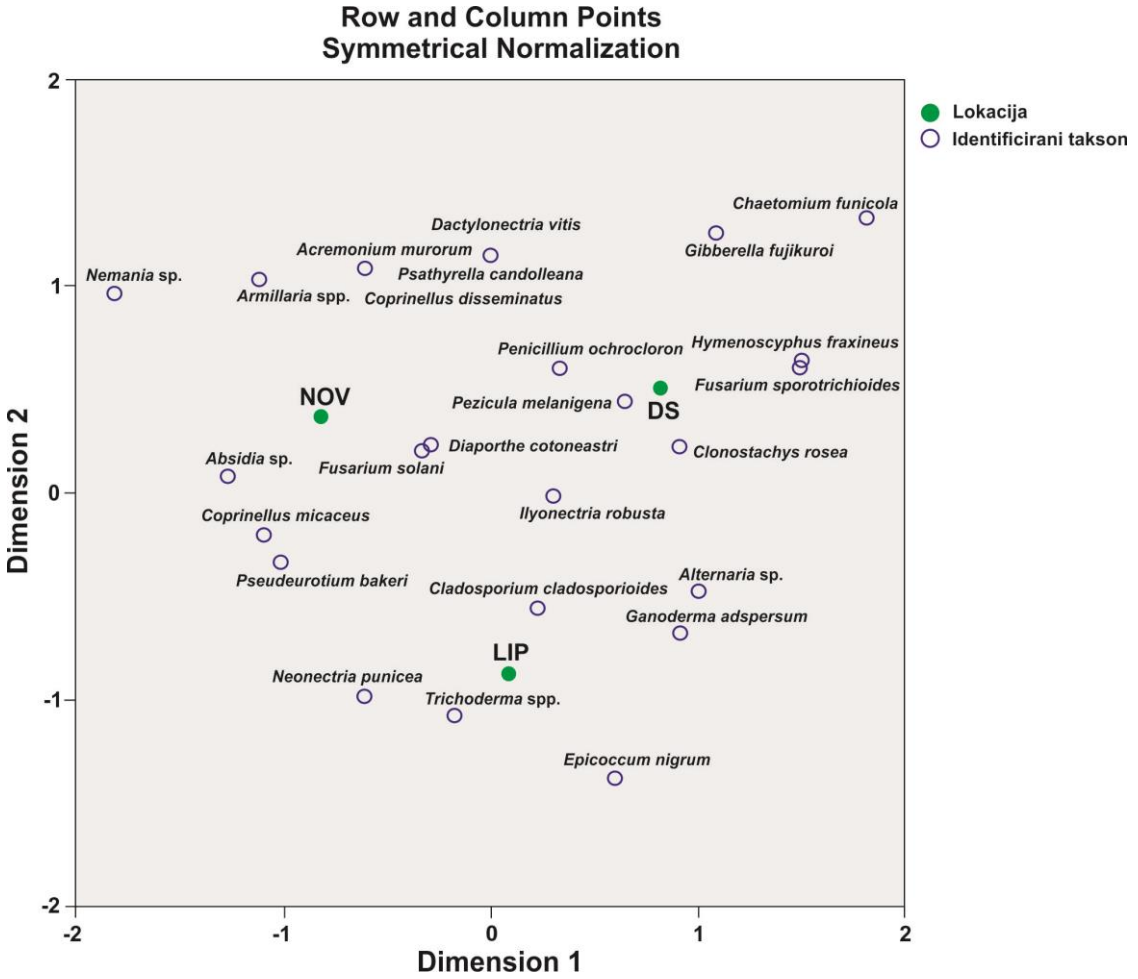
Opažena frekvencija *Armillaria* spp.	2	4	5	Opažena frekvencija *Ganoderma adspersum*	1	4
	Broj stabala s opaženom frekvencijom				Broj stabala s opaženom frekvencijom	
Dugo Selo	0	0	1	Dugo Selo	0	1
Lipovljani	0	0	0	Lipovljani	5	0
Novska	4	2	1	Novska	0	0

Tablica 46. Broj stabala na svakoj od geografskih lokacija na kojima se takson javlja prema opaženim frekvencijama (broju izolata) za *Coprinellus micaceus*

Opažena frekvencija *Coprinellus micaceus*	1	2	4	5	7
	Broj stabala s opaženom frekvencijom				
Dugo Selo	0	0	0	0	0
Lipovljani	5	0	1	0	0
Novska	0	2	0	1	1

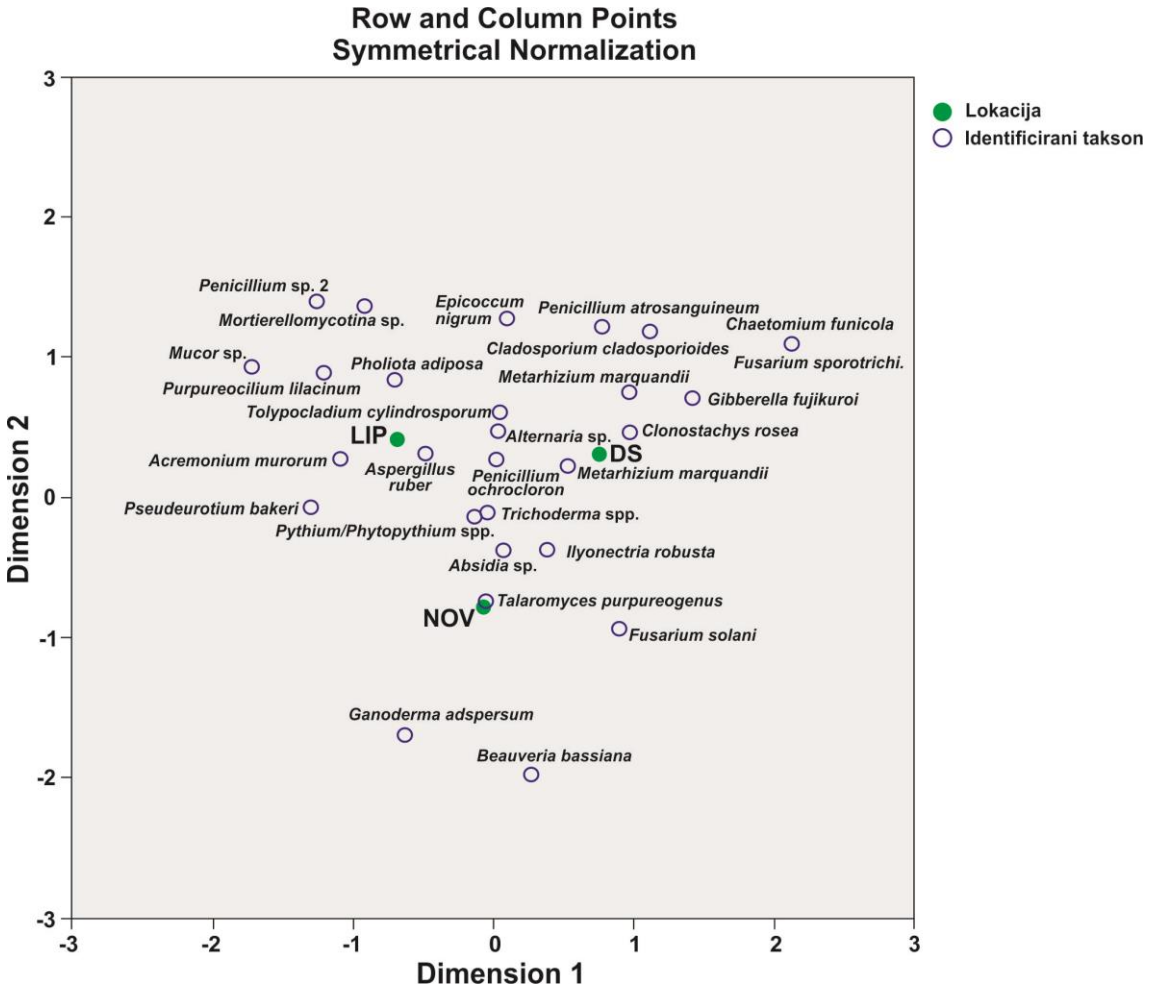
Tablica 47. Broj stabala na svakoj od geografskih lokacija na kojima se takson javlja prema opaženim frekvencijama (broju izolata) za *Trichoderma* spp.

Opažena frekvencija *Trichoderma* spp.	1	2	3	4	5	6	9
	Broj stabala s opaženom frekvencijom						
Dugo Selo	6	0	0	0	0	0	0
Lipovljani	10	1	1	1	1	1	1
Novska	2	4	2	0	0	0	0



Slika 31. Grafički prikaz relativne povezanosti utvrđenih taksona gljiva na korijenu s geografskim lokacijama uzorkovanja pomoću analize korespondencije

Od taksona prisutnih u tlu za koje je utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji, *Gibberella fujikuroi* gotovo isključivo pridolazi u Dugom Selu, s iznimkama po jednog stabla na preostalim lokacijama, dok je *Fusarium solani* najbrojnija u Novskoj, a u Lipovljanima u tlu uopće nije zabilježena (Tablica 48). Analiza korespondencije potvrđuje relativno veću povezanost ovih taksona s lokacijama u Dugom Selu, odnosno u Novskoj. Na grafičkom je prikazu isto tako vidljiva i relativno veća učestalost taksona *Ganoderma adspersum* u Novskoj, gdje su zabilježena tri izolata u tlu oko tri stabla, dok su u Lipovljanima i Dugom Selu utvrđeni samo jedan, odnosno niti jedan izolat ove vrste u tlu (Slika 32). Taksoni *Armillaria* spp. i *Hymenoscyphus fraxineus* nisu zabilježeni u tlu niti na jednoj od istraživanih lokacija, dok je *Diaporthe cotoneastri* utvrđen u okolnom tlu samo jednog stabla u Novskoj, stoga nisu obuhvaćeni u grafičkom prikazu analize korespondencije.



Slika 32. Grafički prikaz relativne povezanosti utvrđenih taksona gljiva i gljivama sličnih organizama u tlu s geografskim lokacijama uzorkovanja pomoću analize korespondencije

Tablica 48. Broj stabala na svakoj od geografskih lokacija na kojima se takson javlja prema opaženim frekvencijama (broju izolata) za *Gibberella fujikuroi* i *Fusarium solani*

Opažena frekvencija *Gibberella fujikuroi*	1	Opažena frekvencija *Fusarium solani*	1	2
	Broj stabala s opaženom frekvencijom		Broj stabala s opaženom frekvencijom	
Dugo Selo	7	Dugo Selo	6	1
Lipovljani	1	Lipovljani	0	0
Novska	1	Novska	5	2

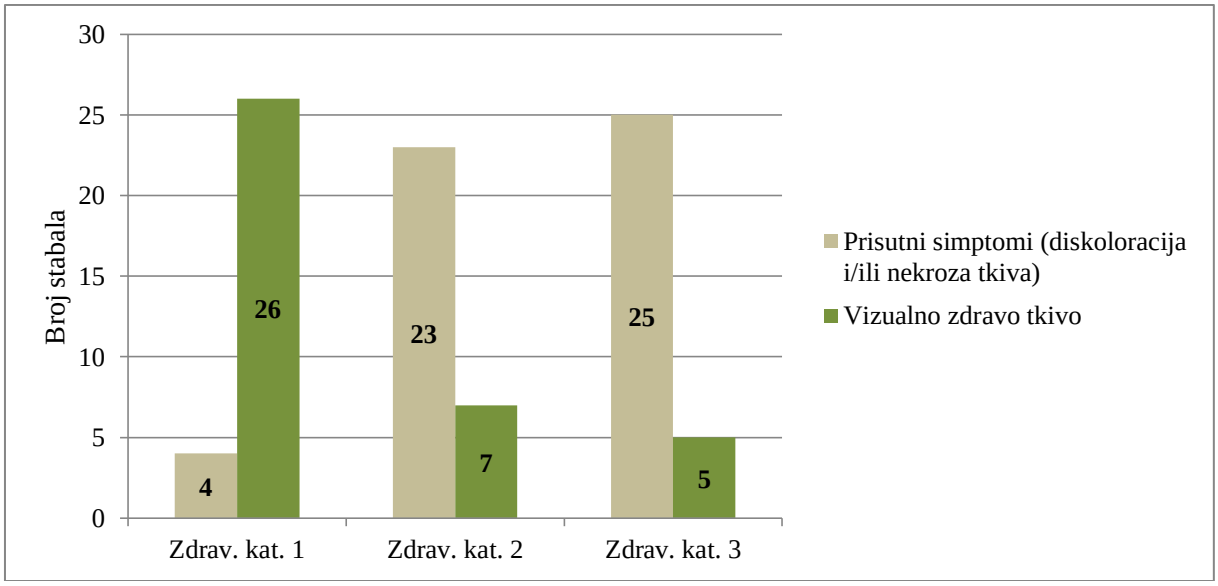
3.1.12 Analiza osutosti krošnje kao pokazatelja zdravstvenog stanja stabla

Sakupljeni uzorci korijena i donjeg dijela debla stabala su kategorizirani prema pojavi diskoloriranog i/ili nekrotičnog tkiva u drvu u simptomatične i asimptomatične (Prilog 3). Površinske ozljede kore se nisu uzimale u obzir kao simptom. Primjenom hi-kvadrat testa je izvršena provjera sljedećih hipoteza:

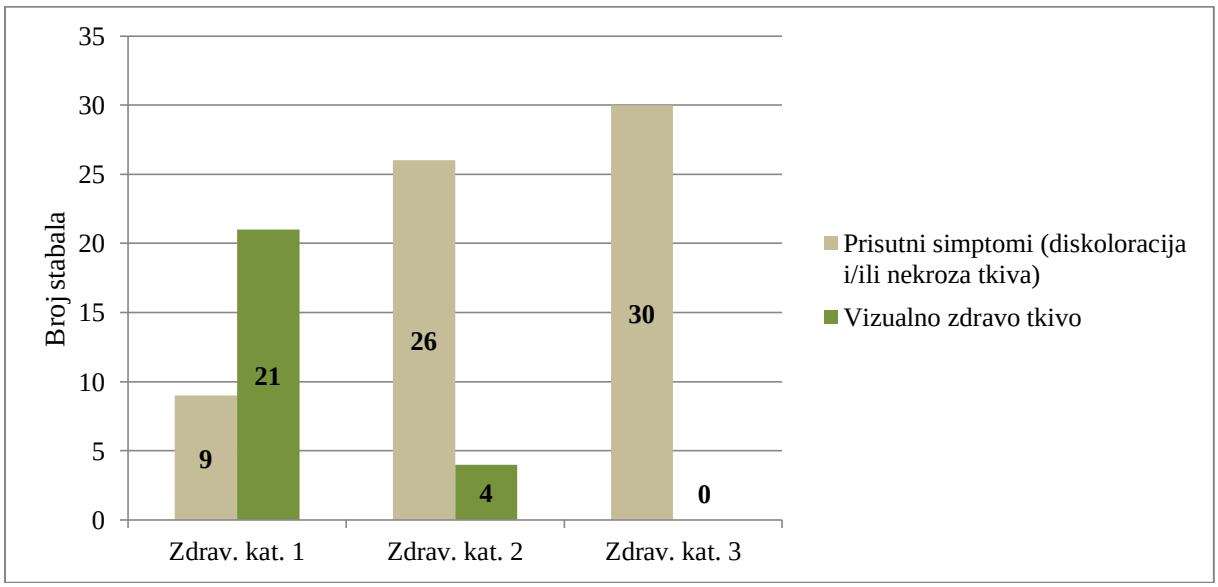
H_0 = Ne postoji povezanost između pojave simptoma na korijenu/deblu i kategorije zdravstvenog stanja stabala.

H_a = Postoji povezanost između pojave simptoma na korijenu/deblu i kategorije zdravstvenog stanja stabala.

Rezultati hi-kvadrat testa su pokazali kako postoji statistički značajna razlika u pojavi simptoma i na korijenu ($p < 0,0001$) i na deblu ($p < 0,0001$) između različitih kategorija zdravstvenog stanja, zbog čega se prihvaća alternativna hipoteza kako postoji povezanost između prisutnih simptoma i zdravstvenog stanja stabala procijenjenog na temelju osutosti krošnje. Iz broja stabala s utvrđenim simptomima u pojedinim kategorijama zdravstvenog stanja je vidljivo kako je najmanji broj simptoma zabilježen na stablima prve, a najveći na stablima treće zdravstvene kategorije (Slika 33, Slika 34).



Slika 33. Broj stabala sa zabilježenim simptomima na donjem dijelu debla po kategorijama zdravstvenog stanja



Slika 34. Broj stabala sa zabilježenim simptomima na korijenu po kategorijama zdravstvenog stanja

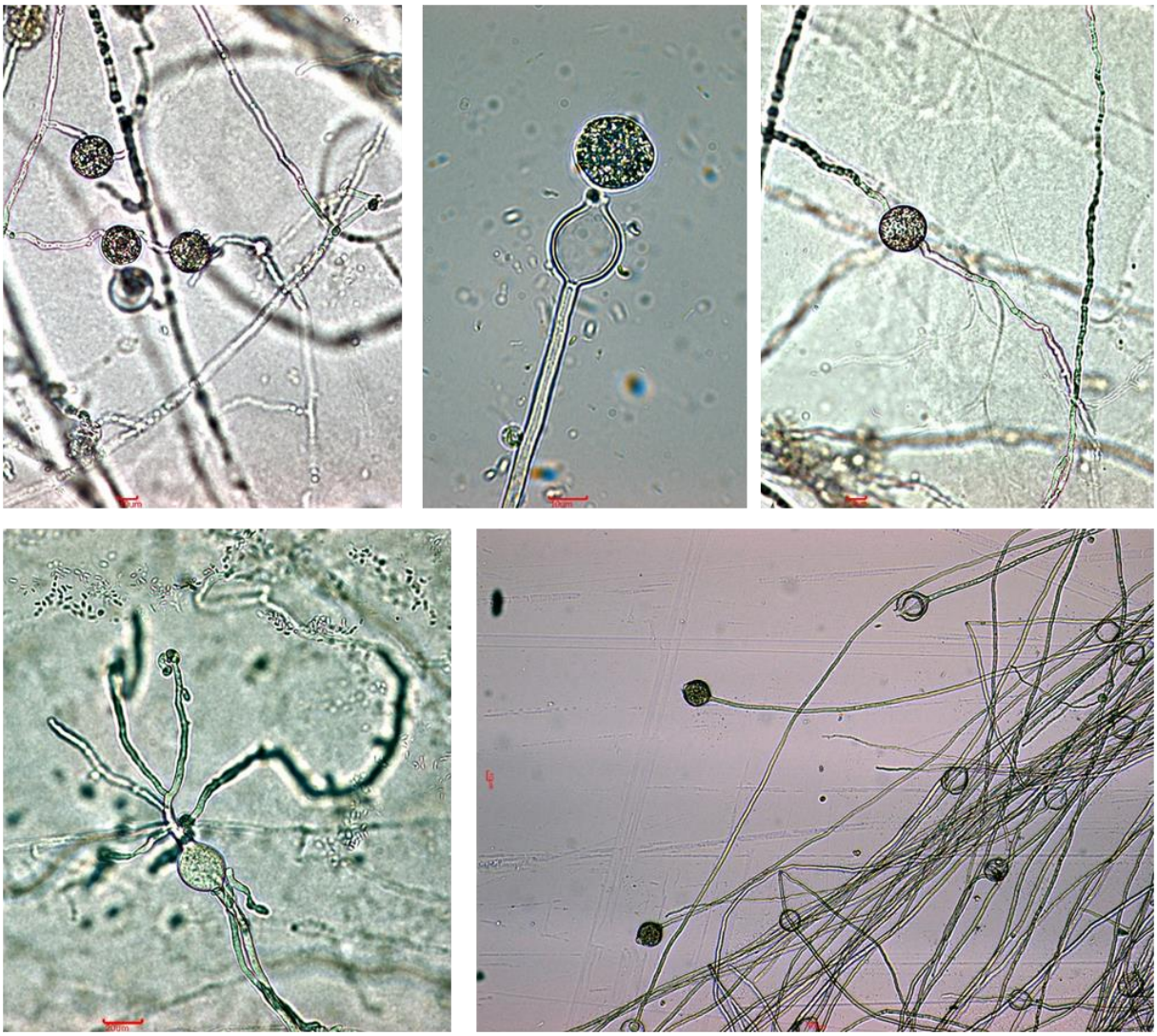
3.2 Prisutnost potencijalno patogenih gljivama sličnih organizama u tlu

3.2.1 Uspješnost izolacije gljivama sličnih organizama iz tla

Prvi su se simptomi na listovima postavljenim na uzorcima tla iz Dugog Sela razvili nakon 5 – 6 dana nakon potapanja tla na svim uzorcima. Simptomi su bili vidljivi u obliku okruglih i nepravilnih kloroza i smeđih i crnih nekroza na sredini i rubovima plojki te onih koje su se širile od vrha ili baze uz središnju žilu prema sredini plojke. Izolacijom iz simptomatičnih listova su dobivene kulture čistih micelija sa značajkama karakterističnim za GSO osim na listovima uzoraka broj 18 i 27 koji su sakupljeni uz stabla prve i druge zdravstvene kategorije. Tvorba sporangija je uspješno inducirana na svim dobivenim kulturama (Slika 35).

Na listovima postavljenima na uzorcima tla iz Lipovljana su se simptomi jednaki onima na listovima uzoraka iz Dugog Sela pojavili nakon 4 do 5 dana na svim uzorcima osim kod tla sakupljenog oko stabla broj 51 koje je na terenu procijenjeno kao stablo zdravstvene kategorije 2. Miceliji karakteristični za gljivama slične organizme su izolirani iz osam od devet uzoraka na kojima su razvijeni simptomi, odnosno nisu dobiveni jedino iz uzorka broj 56 (druga zdravstvena kategorija). Tvorba sporangija je uspješno inducirana na svih osam karakterističnih micelija.

Gotovo svi listovi postavljeni na uzorke tla iz Novske su simptome razvili nakon šest dana, osim listova na uzorku broj 77, gdje su se simptomi pojavili nakon 10 dana. Simptomi su razvijeni kod svih uzoraka te su bili jednaki onima primijećenim na listovima uzoraka tla s prethodne dvije lokacije. Miceliji s vegetativnim morfološkim značajkama karakterističnim za gljivama slične organizme su se razvili kod listova gotovo svih uzoraka, s iznimkom uzoraka broj 78 (zdravstvena kat. 3) i 89 (zdravstvena kat. 2). Od ukupno osam dobivenih čistih kultura karakterističnih micelija, tvorba sporangija je uspješno inducirana kod njih sedam. Kod izolata vezanog uz uzorak broj 86 (zdravstvena kat. 1) nakon potapanja micelija nesterilnom suspenzijom tla nisu primijećene nikakve generativne tvorbe koje bi upućivale na gljivama sličan organizam (Tablica 49).



Slika 35. Neki od sporangija dobivenih potapanjem micelija nesterilnim suspenzijama tla

Tablica 49. Pregled uzoraka tla, uspješnosti izolacije gljivama sličnih organizama te indukcije tvorbe sporangija na dobivenim čistim kulturama micelija

Lokacija	Oznaka stabla/uzorka tla (zdravstvena kat.)	Prisutni simptomi na listovima postavljenim na uzorak tla	Izoliran micelij morfoloških značajki karakterističnih za GSO	Inducirana tvorba sporangija
Dugo Selo, GJ Črnovščak, 16g	4 (3)	DA	DA	DA
	6 (3)	DA	DA	DA
	7 (2)	DA	DA	DA
	8 (1)	DA	DA	DA
	16 (1)	DA	DA	DA
	17 (1)	DA	DA	DA
	18 (1)	DA	**NE**	**NE**
	20 (2)	DA	DA	DA
	27 (2)	DA	**NE**	**NE**
	28 (1)	DA	DA	DA
Lipovljani, GJ Josip Kozarac, 80a	41 (2)	DA	DA	DA
	42 (2)	DA	DA	DA
	43 (3)	DA	DA	DA
	44 (3)	DA	DA	DA
	45 (3)	DA	DA	DA
Lipovljani, GJ Josip Kozarac, 71d	51 (2)	**NE**	**NE**	**NE**
	52 (1)	DA	DA	DA
	54 (1)	DA	DA	DA
	56 (2)	DA	**NE**	**NE**
	58 (3)	DA	DA	DA
Novska, GJ Trstika, 37b	76 (1)	DA	DA	DA
	77 (2)	DA	DA	DA
	78 (3)	DA	**NE**	**NE**
	79 (1)	DA	DA	DA
	80 (2)	DA	DA	DA
	86 (1)	DA	DA	**NE**
	87 (2)	DA	DA	DA
	88 (3)	DA	DA	DA
	89 (2)	DA	**NE**	**NE**
	90 (3)	DA	DA	DA

3.2.2 Identificirane taksonomske jedinice gljivama sličnih organizama u tlu

Od šest izolata odabranih za identifikaciju vrste molekularnim metodama, njih pet je bilo uspješno razvilo sporangije, dok je izolat uzorka broj 86 razvio micelij morfološki karakterističan za gljivama slične organizme, ali bez generativnih tvorbi, zbog čega je posebno odabran za identifikaciju molekularnim metodama.

Iz svih odabranih čistih kultura micelija je izolirana DNA zadovoljavajuće količine i kakvoće. U lančanoj reakciji polimerazom su za sve uzorke izolirane DNA dobiveni specifični produkti veličine približno 800 – 900 pb. Iako se odabrani par početnica pokazao odgovarajućim za umnažanje ciljane regije u PCR reakciji, sekvenciranje početnicom ITS6 nije rezultiralo dovoljno kvalitetnim sekvencama pri istim uvjetima i s jednakim reakcijskim komponentama kao sekvenciranje početnicom ITS4, zbog čega su za identifikaciju vrsta korištene dobivene sekvence iz jednog smjera duljine 641 do 680 pb. Korištenjem inačice algoritma Megablast za sekvence velike sličnosti (highly similar sequences) je za pet sekvenci pronađena podudarnost s već postojećima u NCBI GenBank bazi od 99 %, te za jednu od 95 %, zbog čega je konačna identifikacija izvršena na temelju morfoloških karakteristika.

Tablica 50. Identificirane vrste gljivama sličnih organizama u tlu odumirućih sastojina poljskoga jasena

Oznaka stabla/uzorka tla	Identifikacijski broj sekvence u NCBI GenBank	Vrsta najveće podudarnosti sekvence prema BLAST algoritmu	Identifikacijski broj podudarajuće sekvence u NCBI GenBank	Podudarnost sekvenci %
4	KY708964	*Phytopythium citrinum*	AY197328.1	99
6	KY708965	*Phytopythium citrinum*	AY197328.1	99
43	KY708963	*Phytopythium citrinum*	AY197328.1	99
54	KY708962	*Phytopythium litorale*	KU961901.1	95
76	KY708961	*Pythium lutarium*	KU209134.1	99
86	KY707823	*Pythium anandrum*	AY598650.3	99

Rezultati nisu potvrdili prisutnost patogenih vrsta roda *Phytophthora*, već su pokazali da identificirane vrste pripadaju rodovima *Pythium* i *Phytopythium*. Tri izolata dobivena iz tla oko stabala treće zdravstvene kategorije su identificirana kao vrsta *Phytopythium citrinum* (B. Paul) Abad, De Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Lévesque, dok su preostala tri koja su izolirana iz tla oko stabala prve zdravstvene kategorije identificirana kao tri različite vrste: *Pythium anandrum* Drechsler, *Pythium lutarium* Ali-Shtayeh i *Phytopythium litorale* (Nechw.) Abad, De Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Lévesque (Tablica 50).

4. RASPRAVA

4.1 Utvrđena raznolikost gljiva i njima sličnih organizama

U istraživanju je na čak 86 % uzoraka korijena, odnosno 85 % uzoraka debla te na svim uzorcima tla potvrđena prisutnost gljiva i gljivama sličnih organizama, to jest, nije zabilježeno niti jedno stablo u svim kategorijama zdravstvenog stanja na kojem ovi organizmi nisu bili prisutni, i to prosječno tri do četiri različita taksona po stablu, ovisno o kategoriji uzorka.

Unatoč tome, krivulje akumulacije vrsta koje pokazuju odnos kumulativnog broja utvrđenih taksona i broja uzorkovanih stabala niti u jednom slučaju nisu dosegle asimptotsku vrijednost što znači da bi dodatnim uzorkovanjem zasigurno bilo otkriveno još različitih vrsta (taksona), iako vjerojatno zastupljenih s manjim brojem jedinki na što ukazuju i dobiveni podaci o distribuciji jedinki po taksonima, gdje njih čak 89 % pripada u prvih 29 najčešćih taksona. Slično navode i Kowalski i Kehr (1992), koji su unatoč velikoj raznolikosti utvrđenih vrsta gljiva na granama različitog vazdazelenog i listopadnog drveća, zabilježili svega nekoliko dominantnih vrsta, to jest, približno polovicu otkrivenih vrsta utvrdili na samo jednom ili dva uzorka. Isto tako Kowalski i sur. (2016) iznose podatke o velikoj raznolikosti vrsta u simptomatičnim tkivima debla i grana običnog jasena, od kojih je njih samo nekoliko zastupljeno u većem broju. U sličnim istraživanjima na običnom jasenu (Lygis i sur. 2005, Bakys i sur. 2006, Bakys i sur. 2009b), te na običnoj smreci (*Picea abies* (L.) Karst.) i običnom boru (*Pinus sylvestris* L.) (Menkis i sur. 2006) primjenjenim intenzitetom uzorkovanja također nije iscrpljena stvarna raznolikost vrsta, iako je ispitivan približno jednak ili značajno veći broj uzoraka. Iz krivulja se također može zaključiti kako je stvarna raznolikost gljiva i njima sličnih organizama u tlu i biljnom tkivu izrazito visoka, na što ukazuju i druga istraživanja brojnosti gljiva u biljnom tkivu u kojima se navodi kako u samo jednom tipu tkiva određenih vrsta drveća može pridolaziti više od 100 različitih vrsta (Sieber 2007), odnosno istraživanja tla u kojima je u samo nekoliko grama nađen zapanjujuće velik broj različitih vrsta na temelju kojeg se procjena njihove brojnosti u svijetu popela na čak 5,1 milijuna (O'Brien i sur. 2005).

Na poljskom jasenu se veći broj identificiranih taksona pokazao specifičnim za samo jednu od tri kategorije uzorka (deblo, korijen, tlo), što su potvrdile i izračunate vrijednosti Sørensenovog kvalitativnog i kvantitativnog indeksa sličnosti koje upućuju na razlike u brojnosti i taksonomskoj kompoziciji utvrđenih zajednica gljiva i njima sličnih organizama, posebice kada se uspoređuje biljno tkivo (deblo ili korijen) sa tlom. Specijalizacija gljiva za

pojedine biljne organe, odnosno tkiva, je više puta dokazana u istraživanjima endofitskih zajednica na različitom drveću, poput *Alnus rubra* Bong. (Sieber i sur. 1991), *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. (Halmschlager i sur. 1993), *Quercus robur* L. (Kehr i Wulf 1993) i *Quercus cerris* L. (Ragazzi i sur. 2001), te rjeđe u istraživanjima na simptomatičnom tkivu, primjerice na običnom jasenu (Davydenko i sur. 2013).

Na uzorcima korijena poljskoga jasena je zabilježen veći broj izolata i taksona gljiva u usporedbi s istraživanjima na običnom jasenu (Przybył 2002b, Bakys i sur. 2006), dok je na uzorcima debla zabilježen veći broj izolata ali manji broj taksona u odnosu na istraživanje provedeno u Litvi također na običnom jasenu, gdje je na svega 210 uzoraka nađeno 75 različitih vrsta, moguće zbog načina sakupljanja uzoraka, odnosno uzimanja tkiva na samome prijelazu debla u korijen (Lygis i sur. 2005). Osim mikrolokacije izolacije gljiva na stablu, odnosno lokacije uzimanja uzoraka s obzirom na biljni organ i/ili tkivo koji mogu utjecati na kompoziciju i brojnost vrsta (Kowalski i Kehr 1992), navedene razlike mogu biti posljedica više različitih utjecajnih čimbenika, jer pridolazak i brojnost vrsta ne ovise samo o biljci domaćinu, već i okolišnim uvjetima te metodama sakupljanja uzoraka i izolacije gljiva iz tkiva (Sieber 2007). Upravo je zbog odabranih klasičnih metoda izolacije gljiva i njima sličnih organizama iz tla (*soil dilution plate method, soil plate method, soil baiting method*) u ovome istraživanju na navedenoj kategoriji uzorka dobiven najmanji broj taksona unatoč činjenici da bioraznolikost gljiva u tlu nadmašuje onu u biljnom tkivu (O'Brien i sur. 2005).

Za prikaz raznolikosti vrsta utvrđenih zajednica gljiva i njima sličnih organizama s obzirom na različite kategorije uzorka, zdravstvenog stanja i geografske lokacije uzorkovanja su odabrani Shannonov indeks raznolikosti (H) koji je često primjenjivan u sličnim istraživanjima (Gennaro i sur. 2003, Richard i sur. 2005, Peter i sur. 2008, Haňáčková i sur. 2017) te dodatno i indeks ujednačenosti (E). I raznolikost i ujednačenost vrsta su se pokazale podjednakima za zajednice gljiva i GSO na deblu, korijenu i tlu između različitih kategorija zdravstvenog stanja na svakoj od istraživanih lokacija, odnosno nije utvrđena statistički značajna razlika između njihovih vrijednosti. Unatoč tome je vidljivo kako se najveće vrijednosti indeksa raznolikosti (H) na pojedinim lokacijama i kategorijama uzorka javljaju na stablima zdravstvene kategorije 1 (DS, LIP) te zdravstvene kategorije 2 (NOV), dok se najmanje vrijednosti javljaju na stablima zdravstvenih kategorija 2 (DS) i 3 (LIP, NOV). Zanimljivo je da se unatoč oslabljenim obrambenim mehanizmima stabala poljskoga jasena narušenog zdravstvenog stanja raznolikost taksona u pripadajućim biljnim tkivima i okolnom

tlu ne povećava, kao što je često zabilježeno u drugim istraživanjima (Ragazzi i sur. 2003, Lygis i sur. 2005, Santamaría i Diez 2005, Giordano i sur. 2009).

U većini promatranih kategorija su dobivene srednje vrijednosti indeksa ujednačenosti koje ukazuju na manju razinu ravnomjerne distribucije jedinki po utvrđenim taksonima, odnosno dominantnost pojedinih taksona. Najveće vrijednosti ovog indeksa su zabilježene za zajednice gljiva i GSO na deblima stabala na sve tri geografske lokacije uzorkovanja, pri čemu nije uočena njihova povezanost s kategorijom zdravstvenog stanja stabala. Najmanje vrijednosti indeksa ujednačenosti su uglavnom dobivene za zajednice prisutne u tlu, osim u Novskoj, gdje je najniža vrijednost zabilježena na deblima stabala zdravstvene kategorije 3, uz napomenu kako su zajednice u tlu stabala zdravstvenih kategorija 1 i 3 također pokazale gotovo jednake vrijednosti navedenoj. Moglo bi se zaključiti kako su u zajednicama gljiva i GSO u tlu prevladavali pojedini taksoni s obzirom na broj zabilježenih jedinki. Ovakav rezultat može biti posljedica veće zastupljenosti određenih raširenih taksona u tlu, ali dijelom i upotrebljenih metoda izolacije gljiva i GSO iz tla koje prednost daju brzorastućim vrstama (*soil plate method, soil dilution plate method*) ili vrstama plivajućih spora (*soil baiting method*).

4.2 Identificirani taksoni gljiva i gljivama sličnih organizama i njihov utjecaj na zdravstveno stanje stabala

S obzirom da su slični pokušaji identifikacije različitih vrsta gljiva i njima sličnih organizama u biljnom tkivu i tlu u Republici Hrvatskoj provođeni drugačijom metodologijom te s različitim ciljevima na šumskim vrstama drveća (Diminić i sur. 2002, Pernek i sur. 2011, Milotić i sur. 2012, Zgrablić 2015), pretpostavlja se kako je veći broj taksona identificiranih ovim istraživanjem prvi puta formalno zabilježen za naše područje. Kako u Republici Hrvatskoj ne postoji jedinstvena javno dostupna baza identificiranih vrsta mikrogljiva i njima sličnih organizama, točan broj onih koje prije ovog istraživanja nisu utvrđene je nemoguće točno odrediti, ali je pregledom baze na portalu znanstvenih časopisa Republike Hrvatske (http://hrcak.srce.hr/), digitalne arhive Hrvatskoga šumarskog društva (http://sumlist.sumari.hr/goosl.asp), mrežnih stranica Hrvatske znanstvene bibliografije (https://bib.irb.hr/index.html) te Enciklopedije gljiva (Božac 2005), utvrđeno kako je od 66 vrsta identificiranih na poljskom jasenu i u okolnom tlu, njih 27 dosad zabilježeno u Republici Hrvatskoj. Iako su se za pretragu koristili svi poznati sinonimi za danu vrstu kako ih navodi baza Index Fungorum (http://www.indexfungorum.org/), moguće je da su još neke vrste ranije utvrđene na području Republike Hrvatske ukoliko se ne navode u nabrojanim bazama.

Metodološki slična istraživanja uloge gljiva i gljivama sličnih organizama u odumiranju šumskog drveća su provedena na nekoliko različitih listopadnih i vazdazelenih vrsta izvan Republike Hrvatske, pri čemu u posljednjih nekoliko godina prednjače ona na običnom jasenu (*Fraxinus excelsior* L.), dok za poljski jasen (*Fraxinus angustifolia* Vahl) u navedenom smislu osim ovog istraživanja gotovo i nema dostupnih podataka, zbog čega se većina dobivenih rezultata uspoređuje s onima dobivenim prvenstveno na običnom jasenu ali dijelom i nekim drugim vrstama.

Na poljskom je jasenu identificirano ukupno 80 različitih taksonomskih jedinica, odnosno u pojedinim slučajevima grupa (Tablica 12 – 15, Prilog 2), od kojih su prisutnošću i brojem jedinki najzastupljenije vrste odjela *Ascomycota*, uz svega nekoliko taksona odjela *Basidiomycota* i *Zygomycota*, slično kao i u biljnom tkivu običnog jasena sa simptomima odumiranja (Lygis i sur. 2005, Bakys i sur. 2006, Bakys i sur. 2009b, Bakys i sur. 2011, Davydenko i sur. 2013, Kowalski i sur. 2016). U tlu sastojina poljskoga jasena su također u velikom broju utvrđeni gljivama slični organizmi koji spadaju u odjel *Oomycota* carstva *Straminipila*, koji su u većoj mjeri zabilježeni i u tlu odumirućih sastojina hrasta lužnjaka na manjem ili većem dijelu stabala (Jung i sur. 2000, Balcì i Halmschlager 2003b, a, Jönsson i sur. 2003, Jankowiak i sur. 2015). Navedeni organizmi nisu utvrđeni u biljnom tkivu poljskoga jasena u ovom istraživanju, iako su određene vrste zabilježene na nekrozama korijena i debla običnog jasena u Poljskoj (Orlikowski i sur. 2011) te identificirane kao uzročnici odumiranja poljskoga jasena u Turskoj (Akilli i sur. 2013b).

Na poljskom jasenu i okolnom tlu u istraživanim sastojinama je utvrđen približno jednak broj izolata gljiva i njima sličnih organizama kategoriziranih kao endofiti, paraziti i saprotrofi, iako je utvrđeni broj taksona parazita gotovo dva ili tri puta manji u odnosu na ostale dvije kategorije. Veći broj izolata parazita u odnosu na broj taksona može biti posljedica kompetitivne sposobnosti koju im omogućuju različite strategije koje su evolucijski morali razviti kako bi savladali obrambene mehanizme biljke (Underwood 2012, Bisen i sur. 2015), ili se može raditi o odrazu općenito narušenog zdravstvenog stanja stabala kojim se stvaraju pogodni uvjeti za širenje oportunističkih parazita (Desprez-Loustau i sur. 2006). Pritom navedene kategorije treba shvaćati uvjetno, jer velik broj taksona može prelaziti s jednog na drugi način života ovisno o raznim čimbenicima (Cooke i Whipps 1993, Carlile i Watkinson 1994, Redman i sur. 2001, Sieber 2007), a ovdje su kategorizirani prema prevladavajućem načinu života i ishrane koji se navode u literaturi. Nijedan od taksona identificiranih u ovome istraživanju nije svrstan u ekto- ili endomikorizne gljive. Kako je cilj bio determinirati vrste

gljiva i gljivama sličnih organizama dobivene izolacijom na umjetne hranjive podloge, a vrste koje stvaraju arbuskularni tip mikorize se zbog obligatnog biotrofnog načina života ne mogu identificirati na ovaj način, rezultat od nula utvrđenih endomikoriznih gljiva je očekivan. Isto tako, unatoč činjenici da vrste drveća koje su u istraživanim sastojinama pridolazile zajedno uz poljski jasen tvore i ektomikorizu uz arbuskularni tip mikorize (crna joha) (Silvie i sur. 1996) ili samo ektomikorizu (hrast lužnjak) (Kubisch i sur. 2016), u periodu sakupljanja uzoraka nisu primijećena plodišta ektomikoriznih gljiva u krugu polumjera 1,5 m od debla stabala poljskoga jasena.

Najveći broj različitih taksona je zabilježen u biljnom tkivu i okolnom tlu zdravih stabala (zdravstvena kategorija 1), što je djelomično i razlog visokoj raznolikosti utvrđenoj u ovoj kategoriji, dok je najveći broj izolata dobiven iz biljnog tkiva i okolnog tla odumirućih stabala (zdravstvena kategorija 3) (Slika 29, Prilog 3). Specijalizacija utvrđenih taksona s obzirom na zdravstveno stanje stabala je manje izražena kao posljedica znatno manjeg broja taksona utvrđenih na stablima samo jedne kategorije zdravstvenog stanja (24) u odnosu na broj onih koji se javljaju u sve tri kategorije (37). Na to ukazuju i visoke vrijednosti Sørensenovih indeksa sličnosti koje se kreću u rasponu od 0,71 do 0,77 između pojedinih kategorija, a koje su nešto veće ili se približno podudaraju s vrijednostima dobivenim za zajednice gljiva u izbojcima običnog jasena s različitim stupnjem napretka simptoma (Bakys i sur. 2009b). Slično navode i Kowalski i Kehr (1992), koji su mnoge vrste gljiva zabilježili i u živim i u mrtvim granama šumskog drveća, uz objašnjenje kako vrste prisutne u zdravom tkivu imaju prednost u kolonizaciji tkiva koje odumire pred onim vrstama koje dolaze iz okoliša. Isto tako, Haňáčková i sur. (2017) utvrđuju kako nema statistički značajne razlike između zajednica gljiva koje dolaze na stablima običnog jasena zahvaćenih odumiranjem i onima koja su vizualno zdrava. Drugačije rezultate koji upućuju na različitost taksonomske kompozicije zajednica gljiva u simptomatičnim i vizualno zdravim izbojcima običnog jasena su dobili Davydenko i sur. (2013) te Lygis i sur. (2005) za zajednice u deblima zdravih, odumirućih i mrtvih stabala također kod običnog jasena. Autori pomak u kompoziciji vrsta objašnjavaju promjenama u fiziologiji tkiva koje više odgovaraju novopridošlim specijaliziranim vrstama koje potiskuju one postojeće. Međutim, također navode kako takav pomak do objave njihovih rezultata nije zabilježen u šumskoj patologiji te kako na pridolazak vrsta u istom tkivu osim toga snažno utječu i okolišni čimbenici koji prevladavaju na pojedinoj geografskoj lokaciji te koji mogu uzrokovati navedene razlike, što potkrijepljuju činjenicom da je sličnost

taksonomske kompozicije zajednica gljiva koju su sami utvrdili te onih dobivenim u drugim istraživanjima na istim biljnim organima i domaćinu izrazito niska.

To potvrđuju i rezultati ovog istraživanja iz kojih se usporedbom pronađenih zajednica gljiva i GSO na simptomatičnom poljskom i običnom jasenu može zaključiti kako postoje određene podudarnosti u prisutnim vrstama, ali znatno manje u odnosu na razlike, što se može objasniti već spomenutim razlikama u okolišnim uvjetima ali i specijalizacijom pojedinih taksona koji pridolaze samo na jednom ili nekoliko srodnih domaćina, dok su neki taksoni sveprisutni, odnosno mogu u različitom intenzitetu doći na velikom broju domaćina (Kowalski i Kehr 1992).

Ukupno 13 taksona (vrsta) utvrđenih na poljskom jasenu je također identificirano u sličnim istraživanjima prisutnih zajednica gljiva na običnom jasenu sa simptomima odumiranja, uključujući vrstu *Coprinellus disseminatus* na korijenu, deblu i izbojcima (Lygis i sur. 2005, Bakys i sur. 2006, Bakys i sur. 2009b, Bakys i sur. 2011, Haňáčková i sur. 2017), *Pseudeurotium bakeri* na korijenu (Bakys i sur. 2011), *Ganoderma adspersum*, *Psathyrella candolleana* i *Metapochonia bulbillosa* na prijelazu debla u korijen (Lygis i sur. 2005), *Nemania serpens* i *Gibberella baccata* u izbojcima (Haňáčková i sur. 2017), *Armillaria* spp. na korijenu i deblu (Lygis i sur. 2005, Bakys i sur. 2006, Bakys i sur. 2011) te *Hymenoscyphus fraxineus* u peteljkama, izbojcima, granama, deblu i korijenu (Kowalski 2006, Bakys i sur. 2009a, Bakys i sur. 2009b, Kowalski i Czekaj 2010, Davydenko i sur. 2013, Kowalski i sur. 2016).

Četiri taksona nađena u ovom istraživanju koji su zajednički simptomatičnom poljskom i običnom jasenu, *Cladosporium cladosporioides*, *Epicoccum nigrum*, *Fusarium lateritium* i *Fusarium solani* (Griffith i Boddy 1988, Przybył 2002a, Przybył 2002b, Kowalski i Łukomska 2005, Lygis i sur. 2005, Pukacki i Przybył 2005, Bakys i sur. 2006, Vasiliauskas i sur. 2006, Bakys i sur. 2009a, Bakys i sur. 2009b, Kowalski i Czekaj 2010, Chen 2012, Davydenko i sur. 2013, Kowalski i sur. 2016), su vrste širokog rasprostranjenja i niske razine specijalizacije koje su uglavnom u svojstvu endofita također nađene i na drugim vrstama drveća kao što su *Pinus sylvestris* L. (Giordano i sur. 2009), *Populus tremula* L. (Santamaría i Diez 2005) te više vrsta roda *Quercus* (Ragazzi i sur. 2001, Gennaro i sur. 2003, Ragazzi i sur. 2003, Moricca i sur. 2012).

Uzimajući u obzir samo one taksone identificirane do razine vrste, njih 53 zabilježenih na poljskom jasenu nije utvrđeno i na običnom jasenu, ali i obratno, vrste koje brojnošću jedinki prevladavaju na simptomatičnom običnom jasenu poput *Aureobasidium pullulans*, *Gibberella*

avenacea i *Botrysphaeria stevensii* (Pukacki i Przybył 2005, Bakys i sur. 2009b, Kowalski i Czekaj 2010, Davydenko i sur. 2013), nisu nađene na poljskom jasenu u ovom istraživanju. Iako se radi o genetski srodnim vrstama (Gerard i sur. 2006) koje obje diljem Europe u posljednje vrijeme pokazuju sve izraženiji fenomen odumiranja, izgleda da gljive kao biotički čimbenici koji sudjeluju u navedenom procesu za ove dvije vrste nisu potpuno jednaki, a što je vrlo vjerojatno posljedica različitih geografskih lokacija, odnosno okolišnih čimbenika koji na njih utječu (Ragazzi i sur. 2003, Santamaría i Diez 2005, Bakys i sur. 2009b, Moricca i sur. 2012).

Iako je analiza distribucije broja jedinki taksona utvrđenih na poljskom jasenu u tri različite kategorije zdravstvenog stanja pokazala statistički značajnu razliku za taksone *Coprinellus disseminatus* i *Armillaria* spp. na deblu te *Cladosporium cladosporioides* u tlu, koji su ujedno zabilježeni i na običnom jasenu u odumirućim sastojinama, svi preostali taksoni u statistički jednakoj mjeri pridolaze na stablima različitog zdravstvenog stanja. Iz navedenih rezultata proizlazi kako su gljive i njima slični organizmi prisutni u prizemnim i podzemnim dijelovima zdravih stabala poljskoga jasena istovremeno i primarni kolonizatori stabala narušenog zdravstvenog stanja, nakon čega nastavljaju biti prisutni i u odumirućem tkivu, to jest, vrste koje ispoljavaju parazitski ili saprotrofni način života čine to nakon promjene metabolizma domaćina ili pada njegova vitaliteta uzrokovanog nekim drugim biotičkim ili vjerojatnije abiotičkim čimbenicima. Međutim, unatoč rezultatima statističkog testa, iznimku zasigurno čini fitopatogena vrsta *Hymenoscyphus fraxineus*, koja je u dosadašnjim istraživanjima više autora potvrđena kao uzročnik odumiranja stanica kore i drva jasena neovisno o fiziološkom statusu svog domaćina (Kräutler i Kirisits 2012, Gross i sur. 2014, Hauptman i sur. 2016, Diminić i sur. 2017). Kao posljedica dolazi do postupnog odumiranja dijelova zaražena stabla te u konačnici često i do odumiranja čitavog stabla. Ispoljava li koja od ostalih utvrđenih gljiva i GSO u ovom istraživanju svoja patogena svojstva na sličan način je potrebno potvrditi u budućim istraživanjima. Od taksona koji su u literaturi potvrđeni kao paraziti, u ovom su istraživanju učestalo izolirani *Fusarium solani*, *Diaporthe cotoneastri*, *Ganoderma adspersum* i *Armillaria* spp., za koje se shodno njihovoj biologiji, brojnosti te distribuciji u biljnom tkivu stabala različitih kategorija zdravstvenog stanja (Tablica 38) može pretpostaviti kako nakon endofitske faze u zdravom tkivu poljskoga jasena ispoljavaju parazitski način života na stablima narušenog zdravstvenog stanja. Za taksone koji su prema dostupnoj literaturi kategorizirani kao endofiti, odnosno za koje nije poznato ispoljavaju li u biljnom tkivu saprotrofni i/ili parazitski način života, se na temelju dobivene distribucije u biljnom

tkivu stabala različitih kategorija zdravstvenog stanja mogu iznijeti pretpostavke o njihovoj ulozi u odumiranju poljskoga jasena (Tablica 40), ali bez dodatnih istraživanja njihov utjecaj na zdravstveno stanje stabala ostaje nepoznat. Taksoni zabilježeni u ovom istraživanju koji su u literaturi potvrđeni kao saprotrofi, u biljnom tkivu poljskoga jasena češće pridolaze u drugoj i trećoj kategoriji zdravstvenog stanja, gdje imaju ulogu razlaganja odumirućeg i mrtvog tkiva, a njih 14 je utvrđeno i na stablima prve zdravstvene kategorije, što znači da u tkivu poljskoga jasena mogu biti prisutni kao endofiti (Tablica 39).

Sličan je fenomen sekundarne i tercijarne uloge gljiva u odumiranju do danas zabilježen na više različitih vrsta šumskog drveća, uključujući hrast crniku i plutnjak (Brasier 1992), hrast lužnjak (Kehr i Wulf 1993), obični jasen (Bakys i sur. 2009b), običnu smreku (Schulze i sur. 2012) i običnu bukvu (Luchi i sur. 2016). Potkrijepljuje ga i ranije razvijeni konceptualni model odumiranja šuma prema kojem je potrebno vremensko preklapanje djelovanja tri grupe čimbenika kako bi do odumiranja došlo: 1) predisponirajući čimbenici koji djeluju dulje vremensko razdoblje uzrokujući fiziološko slabljenje stabala; 2) inicirajući čimbenici koji pokreću proces odumiranja uzrokujući kratkoročni stres te; 3) pridonoseći čimbenici, prvenstveno oportunistički organizmi, koji na oslabljenim stablima povećavaju ili ubrzavaju intenzitet odumiranja i smrtnosti (Manion 1981). Opisani bi se model na temelju prethodnih iskustava s odumiranjem još jedne nizinske vrste, hrasta lužnjaka (Vajda 1948, Harapin i Androić 1996, Vukelić i sur. 1997), mogao tako primijeniti i na proces koji se odvija u sastojinama poljskoga jasena, gdje bi abiotički čimbenici poput poremećaja vodnog režima, klimatskih promjena i antropogenog utjecaja mogli imati predisponirajuću ulogu, patogeni organizmi poput *Hymenoscyphus fraxineus* inicirajuću ulogu, a oportunističke vrste poput *Armillaria* spp. i drugih organizama pridonositi odumiranju.

U sljedećim se poglavljima opisuje potencijalna uloga 12 taksona kategoriziranih kao paraziti redoslijedom utemeljenim na ukupnom broju dobivenih izolata, te dodatno za pet najčešće izoliranih taksona u ovom istraživanju koji na biljnim vrstama ispoljavaju drugačije načine života i ishrane.

4.2.1 Uloga gljivama sličnih organizama rodova *Pythium* i *Phytopythium*

Na poljskom jasenu su u sve tri kategorije zdravstvenog stanja odmah nakon vrsta roda *Trichoderma* najzastupljeniji gljivama slični organizmi rodova *Pythium* i *Phytopythium* koji su zabilježeni samo u tlu. Identificirani rodovi gljivama sličnih organizama su prvenstveno poznati kao saprotrofi koji koloniziraju svježe biljne ostatke u tlu te u nekim slučajevima i kao

patogeni sitnog korijenja i drugog biljnog tkiva (Deacon 2013), ali kako su u statistički jednakoj mjeri pronađeni u tlu oko stabala svih zdravstvenih kategorija, pri čemu relativno češće pridolaze u okolnom tlu stabala prve zdravstvene kategorije (62 izolata) u usporedbi s preostale dvije (40, odnosno 59 izolata) te nisu izolirani iz biljnog tkiva (Prilog 3), pretpostavlja se kako nemaju neposredan utjecaj na odumiranje poljskoga jasena na istraživanim lokacijama.

4.2.2 Uloga gljive *Fusarium solani*

Takson *Fusarium solani* je u istraživanim sastojinama utvrđen u simptomatičnom i vizualno zdravom tkivu poljskoga jasena s 12 izolata u deblu, 72 u korijenu te 17 u okolnom tlu, na ukupno 14 stabala u prvoj, 17 u drugoj te 13 u trećoj zdravstvenoj kategoriji (Prilog 3). Ova se gljiva također navodi i u simptomatičnim tkivima izbojaka (Przybył 2002a, Pukacki i Przybył 2005, Kowalski i sur. 2016), bazi debla (Lygis i sur. 2005) te sitnom korijenju (Przybył 2002b) običnog jasena narušenog zdravstvenog stanja, gdje se ujedno u testovima patogenosti pokazalo da može prouzrokovati hipersenzitivnu reakciju ali ne i razvoj bolesti na zdravim mladim biljkama. Ova gljiva je poznata kao patogen poljoprivrednih kultura (Coleman 2016) ali i kao uzročnik truleži korijena i raka debla više vrsta drveća, gdje dolazi kao parazit rana i/ili slabosti (Demirci i Maden 2006). U Republici Hrvatskoj je također utvrđena kao uzročnik odumiranja kore grana odraslih stabala topola (*Populus* spp.) posljedicom koje je došlo do odumiranja krošnji (Diminić 2005), tako da se, uz činjenicu da na poljskom jasenu u statistički jednakoj mjeri pridolazi u različitim kategorijama zdravstvenog stanja, pri čemu se relativno češće javlja u biljnim tkivima stabala druge zdravstvene kategorije (Tablica 38, Slika 25, Slika 26), ukazuje na mogućnost njenog djelovanja u svojstvu slabog parazita na stablima promijenjenog metabolizma i/ili narušenog vitaliteta.

4.2.3 Uloga gljive *Diaporthe cotoneastri*

Još jedan od učestalih i parazitskih taksona, *Diaporthe cotoneastri*, je gotovo isključivo izoliran iz biljnog tkiva poljskoga jasena (uz iznimku jednog izolata u tlu), gdje je utvrđen u vizualno zdravom i simptomatičnom tkivu korijena (43 izolata) i debla (16 izolata) na 18 stabala prve, 13 stabala druge te devet stabala treće zdravstvene kategorije (Prilog 3). Prema Udayanga i sur. (2014) je naziv *Diaporthe cotoneastri* sinonim za takson *Diaporthe eres*, zbog čega se u istraživanjima drugih autora ova dva taksona često izjednačavaju, iako baza *Index Fungorum* (http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp) u kojoj se navode trenutačno prihvaćeni puni znanstveni nazivi vrsta i viših taksonomskih jedinica odvaja

Diaporthe cotoneastri i *Diaporthe eres* kao dvije zasebne vrste. Unatoč tome, oba se taksona, bez obzira razmatraju li se kao jedna ili dvije vrste, u trenutno dostupnoj literaturi navode kao patogeni drvenastog bilja koji mogu uzrokovati nekrotične lezije, odnosno rak debla te odumiranje izbojaka i mladih biljaka drvenastih vrsta (Abreo i sur. 2012, Kaliterna i sur. 2012, Thomidis i Michailides 2009). S druge strane, patogenost *Diaporthe eres* na običnom jasenu nije potvrđena unatoč čestim izolacijama s ruba nekrotičnog tkiva (Kowalski i sur. 2017). U ovom istraživanju je utvrđeno kako vrsta statistički jednako dolazi u deblu, korijenu i okolnom tlu stabala različitog zdravstvenog stanja što znači da postoji mogućnost kako u tkivu u kojem je već prisutna nastavlja živjeti parazitski nakon utjecaja nekog od stresnih čimbenika, vjerojatno u manjem broju te uglavnom u ranijim fazama odumiranja pošto relativno češće pridolazi na stablima prve i druge zdravstvene kategorije u odnosu na treću (Tablica 38).

4.2.4 Uloga vrsta roda *Armillaria*

Vrste roda *Armillaria* se generalno smatraju oportunističkim patogenima koji inficiraju domaćine oslabljene određenim stresnim čimbenicima (Wargo 1977, Singh 1983, Entry i sur. 1986). U ovom su istraživanju jedinke navedenog roda nađene na dvije lokacije, isključivo u simptomatičnom tkivu poljskoga jasena, na korijenu u sve tri zdravstvene kategorije stabala, dok na deblu samo na stablima značajno osute krošnje (zdrav. kat. 2 i 3). Kako se većina infekcija vrstama roda *Armillaria* ostvaruje putem korijena, logično je da se u fazi kada gljiva uznapreduje do donjeg dijela debla njena prisutnost može statistički značajno povezati s pogoršanim zdravstvenim stanjem stabala, odnosno većom osutošću krošnje kao što su pokazali rezultati statističkih analiza distribucije te analize korespondencije (Tablica 35, Slika 25).

Molekularnim metodama je potvrđena jedino vrsta *Armillaria cepistipes* na uzorku debla stabla druge zdravstvene kategorije iz Novske, što ne isključuje mogućnost pridolaska i drugih vrsta ovog roda, posebice na drugoj lokaciji gdje je potvrđena njihova prisutnost na deblu (tri izolata) dva stabla druge i treće te korijenu (pet izolata) jednog stabla treće zdravstvene kategorije (Dugo Selo), ali se to ne može sa sigurnošću tvrditi pošto su molekularnom identifikacijom jednog uzorka micelija iz korijena stabla treće zdravstvene kategorije dobiveni višeznačni rezultati (*A. sinapina/A. cepistipes/A. gallica*). Za točnu bi identifikaciju trebalo provesti dodatne molekularne analize s početnicama specifičnim za odjel *Basydiomycota* ili čak sam rod. Na poljskom jasenu u klonskoj plantaži zahvaćenoj odumiranjem u Sloveniji su izolacijom iz debla također dobiveni nejednoznačni rezultati

(*A. cepistipes*/*A. gallica*) ali je pritom utvrđena i vrsta izraženijih parazitskih sposobnosti, *A. mellea* (Hauptman i sur. 2016) koja u ovom istraživanju nije nađena. Slična istraživanja u plantažama i sastojinama običnog jasena također identificiraju vrste *Armillaria gallica* na deblima stabala oštećene krošnje (Thomsen i Skovsgaard 2007, Skovsgaard i sur. 2010) te *Armillaria cepistipes* na nekrozama korijena i donjeg dijela debla u svim zdravstvenim kategorijama stabala, čak i na onima koja su s obzirom na osutost krošnje vizualno zdrava (Lygis i sur. 2005, Bakys i sur. 2006, Bakys i sur. 2011). Ovako široka prisutnost vrsta roda *Armillaria* utvrđena u nekoliko različitih istraživanja je pomalo neuobičajeni rezultat s obzirom da se u starijim ekstenzivnim istraživanjima ovih gljiva rod *Fraxinus* ne spominje kao domaćin (Sokolov 1964).

Unatoč pronalasku gljive na vizualno zdravim stablima, nalazi nekih od prethodno navedenih istraživanja upućuju na njenu dugotrajnu prisutnost u svojstvu saprotrofa u jasenovim sastojinama prije početka odumiranja, pri čemu je prijelazak na parazitski način života vjerojatno uvjetovan određenim predisponirajućim čimbenicima od kojih se kao najvažniji navode gljivične infekcije u krošnjama stabala, prvenstveno one uzrokovane patogenom gljivom *Hymenoscyphus fraxineus* (Thomsen i Skovsgaard 2007, Skovsgaard i sur. 2010). Sekundarnu ulogu *Armillaria* spp. potvrđuju i Husson i sur. (2012), koji navode da infekcije ovim vrstama na običnom jasenu nisu utvrđene na istraživanim plohama bez prisutnosti *Hymenoscyphus fraxineus* u krošnji, dok je primjerice obrnuta situacija zabilježena na jednoj plohi. Chandelier i sur. (2016) čak navode kako se u gotovo svim nekrozama (98 %) debla običnog jasena u kojima je prisutna *Armillaria* spp. također javlja i *Hymenoscyphus fraxineus*. Na poljskome jasenu na istraživanim lokacijama u Posavini nije utvrđena istovremena prisutnost obje gljive na bazi debla i/ili korijenu, iako su u Dugom Selu i jedna i druga nađene unutar istog odsjeka, dok u Novskoj *H. fraxineus* uopće nije utvrđena što može značiti kako se na većini stabala radi o starijim nekrozama u kojima je *Armillaria* spp. kao sekundarni patogen sukcesivno zamijenila primarno prisutnu vrstu (Enderle i sur. 2017).

Međutim, vrste roda *Armillaria* bi mogle imati i izraženiju ulogu u odumiranju, kako se i pokazalo na primjeru njihove interakcije s vrstama roda *Phytophthora* te drugim stresnim čimbenicima na stablima roda *Quercus*, što je rezultiralo većim nastalim štetama nego kada su navedeni čimbenici djelovali sami (Marçais i Bréda 2006, Marçais i sur. 2011). Hauptman i sur. (2016) također navode kako vrste roda *Armillaria* mogu uzrokovati izražene nekroze na deblima poljskoga jasena bez simptoma odumiranja u krošnji. Isto tako postoji mogućnost da prisutnost vrsta roda *Armillaria* ali i drugih parazitskih gljiva u tkivu omogućava i/ili ubrzava

širenje *Hymenoscyphus fraxineus* te napredak simptoma odumiranja na rodu *Fraxinus* (Husson i sur. 2012, Enderle i sur. 2013, Haňáčková i sur. 2017), što potkrijepljuju rezultati istraživanja Marçais i sur. (2016) koji pokazuju da, iako je na običnom jasenu većina nekroza debla povezana s *H. fraxineus*, na njihov intenzitet primarno utječu vrste roda *Armillaria*. Enderle i sur. (2017) naglašavaju kako su unatoč primarnim infekcijama patogene gljive *H. fraxineus,* upravo gljive roda *Armillaria* odgovorne za širenje nekroza te naposljetku i prstenovanje kambija na korijenovom vratu, odnosno u prvoj fazi uzrokuju značajno smanjenje prirasta te potom i smrt stabla u roku od nekoliko godina. Ova je pojava, iako nije detaljno dokumentirana, primijećena i na lokaciji uzorkovanja u Novskoj, gdje je zabilježeno 27 jedinki *Armillaria* spp. u odnosu na njih osam u Dugom Selu te shodno tome i izvaljena jasenova stabla značajno oštećenog korijenovog sustava.

4.2.5 Uloga gljive *Hymenoscyphus fraxineus*

Na poljskom jasenu u Republici Hrvatskoj je u prethodnim istraživanjima patogena gljiva *Hymenoscyphus fraxineus* potvrđena na deblu i krošnji većeg broja stabala sa simptomima odumiranja na više različitih lokacija uključujući i one u Posavini (Diminić 2015, Milotić i sur. 2016), a u ovom je istraživanju nađena isključivo na simptomatičnom tkivu korijena i donjeg dijela debla svega osam stabala, od čega sedam umjerene i jake osutosti krošanja (zdrav. kat. 2 i 3) s iznimkom jednog izolata koji je dobiven iz korijena stabla osutosti krošnje manje od 25 % (zdrav. kat. 1) u Lipovljanima, međutim također iz simptomatičnog tkiva. Iako nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji ove gljive na stablima različitog zdravstvenog stanja, analiza korespondencije taksona na korijenu, gdje je *H. fraxineus* uglavnom i nađena, ukazuje na njen relativno češći pridolazak na stablima treće zdravstvene kategorije što je u skladu s njenim statusom patogena na poljskom jasenu (Kirisits i sur. 2010). Ovako malen udio stabala na kojima je gljiva prisutna u odnosu na njihov ukupni broj obuhvaćen istraživanjem potvrđuje tezu kako se radi o uzročniku odumiranja koji se, iako može biti prisutan u donjim dijelovima debla i na korijenu (Kowalski 2006, Husson i sur. 2012), uglavnom povezuje sa simptomima u krošnji te gornjim dijelovima debla (Skovsgaard i sur. 2010) ili može označavati raniji stadij širenja patogena u kojem još nije postignut dovoljan infekcijski inokulum za zaraze baze debla (Marçais i sur. 2016, Enderle i sur. 2017).

Međutim, na stablima na kojima *Hymenoscyphus fraxineus* uzrokuje simptome odumiranja, iako većim dijelom u gornjim dijelovima stabala, postoji veća vjerojatnost pridolaska drugih patogena, prvenstveno uslijed smanjene obrambene sposobnosti stabala što može također uzrokovati prijelaz određenih vrsta prisutnih u tkivu s endofitskog na parazitski način života

(Sieber 2007). Shodno tome, Kowalski i sur. (2016) bilježe veći broj određenih vrsta gljiva u simptomatičnom tkivu običnog jasena u usporedbi s istraživanjima provedenim u ranim fazama odumiranja kada ovaj patogen još nije bio u tolikoj mjeri prisutan u sastojinama.

Prisutnost patogena i uzrokovane nekroze na korijenu i donjem dijelu debla poljskoga jasena, te simptomi u gornjim dijelovima stabala su vrlo vjerojatno posljedica odvojenih infekcijskih procesa, što se može potkrijepiti činjenicom da lenticele na vratu korijena predstavljaju pogodna mjesta infekcije putem kojih spore patogena mogu napasti domaćina (Garbelotto 2004, Jung i Blaschke 2004), pri čemu poplave mogu utjecati na povećanje broja lenticela na deblu (Fink 1999), a visoka vlaga tla može pogodovati preživljavanju gljive na peteljkama u listincu i proizvodnji askospora, odnosno povećanju infekcijskog inokuluma (Husson i sur. 2012). Chandelier i sur. (2016) potvrđuju prizemne infekcije ovog patogena putem kore na donjem dijelu debla običnog jasena navodeći kako su podložna stabla različite dobi, uključujući i ona promjera većeg od 25 cm.

4.2.6 Uloga gljive *Ganoderma adspersum*

Takson *Ganoderma adspersum* je u ovom istraživanju utvrđen u vizualno zdravom i simptomatičnom biljnom tkivu poljskoga jasena, na deblu (11 izolata), korijenu (devet izolata) te okolnom tlu (četiri izolata) stabala, pri čemu je relativno češće zabilježen u drugoj kategoriji zdravstvenog stanja (osam stabala) u usporedbi s preostale dvije (tri, odnosno četiri stabla u prvoj i trećoj kategoriji) (Tablica 38, Prilog 3). De Simone i Annesi (2012) ovu vrstu opisuju kao uzročnika bijele truleži i patogena korijena i baze debla živih stabala koji svoj rast može nastaviti kao saprotrof na mrtvom tkivu, pri čemu navode kako progresiji gljive pogoduju određeni predisponirajući čimbenici, poput rana ili stresa uzrokovanog poremećajem vodnog režima. Gljiva je utvrđena na korijenovu vratu simptomatičnih stabala običnog jasena u odumirućim sastojinama u Litvi (Lygis i sur. 2005), te također i u Republici Hrvatskoj gdje je u prošlosti zabilježena na vrstama roda *Fraxinus*, ali bez detaljnih zapisa o njenoj patogenosti za domaćine (Tortić 1970). Na temelju dosadašnjih spoznaja o biologiji gljive iz dostupne literature te distribucije izolata dobivenih ovim istraživanjem, može se pretpostaviti kako *Ganoderma adspersum* na stablima narušenog zdravstvenog stanja može ovisno o fiziološkom statusu tkiva ispoljavati i parazitski i saprotrofni način života, pri čemu je ili već ranije prisutna u zdravom tkivu kao endofit, ili u stabla ulazi putem rana na kori.

4.2.7 Uloga gljive *Gibberella fujikuroi*

U ovom istraživanju su na poljskom jasenu zabilježena tri izolata taksona *Gibberella fujikuroi* na deblu, pet izolata na korijenu te njih devet u okolnom tlu stabala, u vizualno zdravom i simptomatičnom tkivu, relativno češće u drugoj zdravstvenoj kategoriji (osam stabala) u odnosu na preostale dvije (po tri stabla u svakoj) (Tablica 38, Prilog 3). Iako se ova gljiva u literaturi navodi kao parazit koji na biljke utječe lučenjem hormona rasta giberelina, dosad je njena patogenost potvrđena samo na poljoprivrednim kulturama poput riže i kukuruza (Hsuan i sur. 2011), stoga ostaje nepoznato ispoljava li parazitski ili saprotrofni način života nakon endofitske faze u tkivu poljskoga jasena.

4.2.8 Uloga gljive *Aspergillus ruber*

U istraživanju je utvrđeno ukupno 15 izolata taksona *Aspergillus ruber* (osam na deblu, tri na korijenu i četiri u okolnom tlu) u vizualno zdravom i simptomatičnom biljnom tkivu u sve tri kategorije zdravstvenog stanja stabala (pet u prvoj, četiri u drugoj te dva u trećoj) (Prilog 3, Tablica 38). Slično kao i kod taksona *Gibberella fujikuroi*, patogenost ove gljive je dosad potvrđena samo na poljoprivrednim kulturama, gdje uzrokuje propadanje skladištenog sjemena i plodova, poput graška (*Pisum sativum* L.) i soje (*Glycine max* (L.) Merrill) (Harman i Granett 1972, Dhingra i sur. 2001), stoga se ne može sa sigurnošću znati prelazi li nakon endofitske faze u vizualno zdravom tkivu poljskoga jasena na parazitski ili saprotrofni način života.

4.2.9 Uloga gljive *Fusarium sporotrichioides*

Ovaj se takson u literaturi navodi kao patogen na vrstama roda *Pinus*, gdje uzrokuje trulež korijena i rak na stabljikama sadnica te odumiranje iglica odraslih stabala (Ivanová i sur. 2016). Kako je u ovom istraživanju na poljskom jasenu utvrđen relativno mali broj izolata (četiri na deblu, pet na korijenu, četiri u okolnom tlu) koji su u biljnom tkivu gotovo jednako distribuirani u sve tri kategorije zdravstvenog stanja stabala (Tablica 38, Prilog 3), pretpostavka je kako nema dominantnu ulogu u odumiranju poljskoga jasena.

4.2.10 Uloga gljive *Pholiota adiposa*

Takson *Pholiota adiposa* je na poljskom jasenu utvrđen uglavnom u okolnom tlu stabala (osam izolata) dok su svega dva izolata dobivena iz biljnog tkiva, jedan iz vizualno zdravog tkiva debla te jedan iz simptomatičnog tkiva korijena, oba na stablima druge zdravstvene kategorije (Prilog 3, Tablica 38). Kako je ovaj takson u literaturi zabilježen na običnoj bukvi

kao slabi parazit koji ispoljava i saprotrofni način života (Noordeloos i sur. 1999), a u ovom je istraživanju utvrđen relativno mali broj izolata, vrlo vjerojatno nema izraženu patogenu ulogu u odumiranju poljskog jasena.

4.2.11 Uloga gljive *Dactylonectria vitis*

Iako se takson *Dactylonectria vitis* u literaturi navodi kao jedan od kompleksa taksona koji uzrokuju nekrotične lezije na korijenu vinove loze te naposljetku i odumiranje čitavih biljaka (Cabral i sur. 2012), na poljskom jasenu je utvrđeno svega pet izolata (četiri u simptomatičnom tkivu korijena i jedan u tlu) na četiri stabla (dva u trećoj te po jedno u prvoj i drugoj zdravstvenoj kategoriji), zbog čega njegova uloga u odumiranju nije istaknuta iako u tkivu može ispoljavati parazitski način života.

4.2.12 Uloga gljive *Leucostoma persoonii*

U ovom je istraživanju dobiven svega jedan izolat taksona *Leucostoma persoonii* iz simptomatičnog tkiva korijena stabla druge zdravstvene kategorije, stoga se ne može govoriti o njegovoj izraženoj ulozi u odumiranju jasena, iako je u literaturi poznat kao parazit koji uzrokuje odumiranje izbojaka i grana, rak kore i odumiranje čitavih stabala vrsta roda *Prunus* (Romanazzi i sur. 2011).

4.2.13 Uloga ostalih često izoliranih taksona gljiva i gljivama sličnih organizama

Na poljskom jasenu su u sve tri kategorije zdravstvenog stanja među najzastupljenijim taksonima s obzirom na broj jedinki bile prisutne vrste roda *Trichoderma* nađene i na biljnom tkivu (korijen, deblo) i u tlu. Vrste roda *Trichoderma* su široko rasprostranjeni saprotrofni kolonizatori tla i biljnog tkiva, ali su također opisane i kao endofiti u biljkama (Evans i sur. 2003). Poznate su i kao antagonisti patogenih gljiva koji se često upotrebljavaju u biološkoj kontroli biljnih bolesti (Vinceković i sur. 2016), pri čemu koristi koje biljka može ostvariti uključuju povećanje otpornosti na bolesti, poboljšanje rasta, te otpornost na stres uzrokovan abiotičkim čimbenicima (Harman i sur. 2004, Bae i sur. 2009). Vrste roda *Trichoderma* su u ovom istraživanju, osim iz tla, izolirane i iz vizualno zdravog i simptomatičnog tkiva poljskoga jasena. Od vrsta prisutnih u tkivu su molekularnim metodama potvrđene *T. hamatum*, koja je poznata kao antagonist patogenih gljiva i njima sličnih organizama na poljoprivrednim kulturama, uključujući *Fusarium oxysporum* E.F. Sm. & Swingle (El-Hassan i sur. 2013) i *Pythium* spp. (Harman i sur. 1981), te *T. harzianum*, u literaturi također opisana kao sredstvo biološke kontrole protiv patogenih gljiva i GSO u tlu (Elad i sur. 1982), ali i kao

uzročnik reduciranog rasta gljiva koje stvaraju arbuskularnu mikorizu (Green i sur. 1999). Usporedbom distribucije jedinki taksona *Trichoderma* spp. u različitim kategorijama zdravstvenog stanja poljskoga jasena nije dobivena statistički značajna razlika niti u jednoj kategoriji uzorka, iako analize korespondencije pokazuju njihovu relativno veću povezanost s biljnim tkivom stabala druge i treće zdravstvene kategorije. Međutim, bez dodatnih istraživanja je teško zaključiti je li njihov utjecaj na stabla negativan, kao što se pokazalo primjerice na sadnicama crnog bora (*Pinus nigra* Arnold) u Italiji (Li Destri Nicosia i sur. 2014), ili pozitivan, kao što se navodi u istraživanjima njihove učinkovitosti u svojstvu biološke kontrole biljnih bolesti (Harman 2000). Kako bi se s većom točnošću mogla procijeniti njihova potencijalna uloga u povećanju otpornosti poljskoga jasena na uzročnike odumiranja, odnosno utvrditi mogu li usporiti navedeni proces, u budućim bi istraživanjima trebalo usporediti njihovu brojnost u tlu i biljnom tkivu stabala između zdravih i odumirućih sastojina ili sastojina u kojima proces teče različitom brzinom.

Jedna od najčešće izoliranih je i vrsta *Ilyonectria robusta*, utvrđena u vizualno zdravom i simptomatičnom tkivu, gotovo uvijek na korijenu. Iako se navodi kao patogen korijena vinove loze (*Vitis labrusca* L.) (dos Santos i sur. 2013) te azijskog ginsenga (*Panax ginseng* CA Meyer) (Lu i sur. 2014), na korijenju šumskog drveća se smatra endofitom (izvor: http://genome.jgi.doe.gov/Ilyrob1/Ilyrob1.home.html). Na poljskom je jasenu bila statistički jednako distribuirana u sve tri kategorije zdravstvenog stanja, tako da postoji mogućnost da promjenom metabolizma i/ili padom vitaliteta stabala prelazi s endofitskog na parazitski način života, pri čemu bi zbog brojnosti mogla imati veću ulogu u ubrzavanju procesa odumiranja.

Absidia sp. je u najvećem broju izolirana iz okolnog tla stabala gdje prema analizi korespondencije relativno podjednako pridolazi u sve tri zdravstvene kategorije, te u znatno manjoj mjeri i iz vizualno zdravog i asimptomatičnog biljnog tkiva. Vrste ovog roda su poznate kao saprotrofi rašireni u tlu (Deacon 2013), što je u kombinaciji s upotrebljenim metodama izolacije rezultiralo njihovom visokom brojnošću dobivenom u ovom istraživanju, očekivano bez statistički značajne povezanosti sa zdravstvenim stanjem poljskoga jasena.

Jedini takson za koji se pokazalo kako postoji statistički značajna razlika njegove distribucije u okolnom tlu stabala tri kategorije zdravstvenog stanja ($p = 0,0105$), je vrsta *Cladosporium cladosporioides* koja je poznata kao endofit u zdravom te primarni kolonizator u odumirućem tkivu različitih biljnih organa na više vrsta domaćina (Kowalski i Kehr 1992, Ragazzi i sur. 2001, Przybył 2002a, Gennaro i sur. 2003, Ragazzi i sur. 2003, Pukacki i Przybył 2005, Bakys i sur. 2009a, Giordano i sur. 2009, Moricca i sur. 2012, Davydenko i sur. 2013,

Kowalski i sur. 2016). Na poljskom je jasenu također često utvrđena na vizualno zdravim i simptomatičnim tkivima u svim zdravstvenim kategorijama stabala, što također upućuje na njenu ulogu ranog kolonizatora tkiva smanjenog vitaliteta, iako u manjoj mjeri jer se prema analizama korespondencije relativno češće veže uz biljna tkiva stabala prve zdravstvene kategorije. Kako je u tlu primarno poznata kao uobičajeni, kozmopolitski saprotrof (Bensch i sur. 2010), a u ovom je istraživanju u navedenom supstratu zabilježen vrlo malen broj izolata, posebice u usporedbi s njihovim brojem u biljnom tkivu, ne može se zaključiti kako prisutnost ove vrste u tlu ima značajan utjecaj na zdravstveno stanje poljskoga jasena unatoč rezultatima statističkog testa.

Jedan od svega dva taksona gljiva za koje je Fisherov egzaktni test pokazao statistički značajnu razliku u distribuciji na deblima stabala različitog zdravstvenog stanja ($p = 0,0322$), je *Coprinellus disseminatus*. Vrsta je primarno poznata kao saprotrof (Gáperová i sur. 2015), ali je zabilježena i na simptomatičnom korijenu te izbojcima običnog jasena (Bakys i sur. 2006, Bakys i sur. 2009b), te također kao endofit u zdravom tkivu izbojaka ove vrste (Haňáčková i sur. 2017). Potonje je potvrđeno i u ovom istraživanju, gdje je *C. disseminatus* na deblu utvrđena isključivo na vizualno zdravom tkivu stabala prve zdravstvene kategorije, što je i utjecalo na dobivanje statistički značajne razlike u distribuciji. Kako je uz to vrsta nađena i u zdravom i simptomatičnom tkivu korijena te tlu u svim kategorijama zdravstvenog stanja te je u istraživanju generalno utvrđena u malom broju, ne može se govoriti o njenoj izraženoj ulozi u odumiranju poljskoga jasena, iako nakon pada vitaliteta stabala nastavlja biti prisutna u tkivu.

Iako se ovdje na temelju istraživanja na drugim vrstama drveća za prethodno nabrojane taksone gljiva i njima sličnih organizama donose pretpostavke o njihovom parazitskom ili saprotrofnom načinu života u tkivima stabala narušenog zdravstvenog stanja, navedene se mogućnosti svakako trebaju dodatno ispitati kako bi se mogle davati pouzdane tvrdnje. Ostali identificirani taksoni gljiva, iako zasigurno na određeni način također sudjeluju u procesu odumiranja poljskoga jasena, teško da pritom imaju ključnu ulogu zbog male brojnosti, statistički jednake zastupljenosti u različitim kategorijama zdravstvenog stanja te primarnog endofitskog ili saprotrofnog načina života opisanog u literaturi.

4.3 Povezanost identificiranih taksona s geografskim lokacijama uzorkovanja

Iako su rezultati ovog istraživanja otkrili relativno visoku sličnost taksonomske kompozicije zajednica gljiva i njima sličnih organizama te pokazali kako je većina identificiranih taksona statistički jednako distribuirana u pojedinoj kategoriji uzorka (deblo, korijen, tlo) na sve tri obuhvaćene lokacije, što bi se moglo objasniti sličnim stanišnim i klimatskim prilikama, statistički značajna razlika u distribuciji je utvrđena za znatno veći broj taksona s obzirom na geografsku lokaciju nego s obzirom na kategoriju zdravstvenog stanja stabala.

Za svega se dva taksona, *Cladosporium cladosporioides* i *Trichoderma* spp., može reći kako razlika u njihovoj distribuciji utvrđena na korijenju stabala proizlazi iz različitog broja izolata kojim su zastupljeni u navedenoj kategoriji uzorka na svakoj od tri obuhvaćene lokacije. Za većinu taksona statistički značajna razlika u distribuciji proizlazi iz njihove odsutnosti u jednoj od kategorija uzorka na pojedinim lokacijama, pri čemu su određeni taksoni zabilježeni isključivo ili gotovo isključivo[3] na jednoj ili na dvije od tri obuhvaćene lokacije. Međutim, ne može se govoriti o njihovoj potpunoj odsutnosti jer su obično u preostale dvije kategorije uzorka prisutni na svim lokacijama, uz iznimke taksona *Nemania serpens* koji je utvrđen isključivo u Dugom Selu te *Coprinellus micaceus* i *Armillaria* spp. koji nisu zabilježeni samo u Dugom Selu, odnosno u Lipovljanima.

Na temelju navedenog se može pretpostaviti kako slični generalni klimatski i stanišni uvjeti dovode do pojave približno istih taksona u podjednakom broju na istraživanim lokacijama, pri čemu bi zabilježene razlike u pridolasku ili brojnosti dijela taksona na razini pojedine kategorije uzorka mogle biti uvjetovane razlikama u mikrostanišnim i mikroklimatskim uvjetima koji vladaju u biljnom tkivu debla i korijena ili u tlu na različitim lokacijama (Talley i sur. 2002, Pouska i sur. 2016), ili uočenim razlikama u biljnim zajednicama na obuhvaćenim lokacijama (Kowalski i Kehr 1992), posebice u sloju prizemnog rašća i grmlja koje mogu ujecati na mikroklimu (Coates 1987, Chandelier i sur. 2016).

Unatoč sličnosti klimatskih i stanišnih uvjeta, lokacija u Dugom Selu se u određenoj manjoj mjeri razlikuje od Lipovljana i Novske, gdje su prosječne mjesečne vrijednosti klimatskih parametara jednake zbog njihove međusobne geografske blizine, što je moglo dovesti do razlike u pojavi vrsta *Nemania serpens* i *Coprinellus micaceus* između Dugog Sela s jedne te Lipovljana i Novske s druge strane. Navedeni podatak objašnjava i rezultat od čak 17 taksona

[3] Pojam gotovo isključivo na jednoj ili dvije lokacije se odnosi na one taksone koji su na ostale dvije ili jednoj lokaciji u istoj kategoriji uzorka zabilježeni samo na jednom stablu.

koji se bez obzira na kategoriju uzorka pojavljuju samo u Dugom Selu, u usporedbi s njih svega pet, odnosno devet u Lipovljanima i Novskoj, iako se većinom radi o taksonima zastupljenim s vrlo malim brojem izolata zbog čega za njih niti nisu utvrđene statistički značajne razlike u distribuciji unutar pojedinih kategorija uzorka na različitim lokacijama.

Pojavu taksona *Armillaria* spp. na dvije od tri obuhvaćene lokacije je teže povezati s generalnim stanišnim i klimatskim čimbenicima, jer ne pridolazi na obje lokacije gdje prevladavaju jednaki klimatski uvjeti. Njena češća prisutnost u Novskoj, rjeđe pridolaženje u Dugom Selu te potpuni izostanak u Lipovljanima bi mogli biti posljedica mikrostanišnih i mikroklimatskih uvjeta u tlu (Rishbeth 1978) ili odraz različitih sukcesijskih faza odumiranja poljskoga jasena pošto se radi o značajnim sekundarnim patogenima koji dolaze na fiziološki oslabljenim stablima. Iako samo na dva stabla, u Lipovljanima su zabilježene rizomorfe vrsta roda *Armillaria* na korijenu što znači da je gljiva tamo prisutna ali se zasad nije uspjela značajno raširiti niti ostvariti infekcije, moguće zbog premalog broja infekcijskih hifa i rizomorfi ili jer su u odnosu na ostale dvije lokacije stabla kraće vremensko razdoblje izložena primarnim uzročnicima odumiranja. Slične teze su iznijete u istraživanjima nekroza baze debla običnog jasena uzrokovanih primarno patogenom *Hymenoscyphus fraxineus* i potom vrstama roda *Armillaria*, gdje autori navode kako njihov razvoj može biti uvjetovan stanišnim i klimatskim prilikama, ali i kako je nakon početka odumiranja krošnji potrebno određeno vrijeme mjereno u godinama za njihov nastanak i širenje, odnosno ulazak i napredak njihovih uzročnika u tkivu, gdje s vremenom sekundarna vrsta zamijeni primarnu (Husson i sur. 2012, Chandelier i sur. 2016, Marçais i sur. 2016, Enderle i sur. 2017). Shodno tome se i na poljskom jasenu u ovom istraživanju pridolazak *Hymenoscyphus fraxineus* na deblu i korijenu prema analizama korespondencije može relativno više povezati sa stablima u Lipovljanima te posebice u Dugom Selu gdje *Armillaria* spp. nije utvrđena ili dolazi na manjem broju stabala, dok u Novskoj gdje relativno češće pridolazi, *Hymenoscyphus fraxineus* uopće nije zabilježen.

Pretpostavkom o različitim sukcesijskim fazama odumiranja na obuhvaćenim lokacijama bi se mogla objasniti i statistički značajno različita distribucija ostalih ovdje navedenih taksona, međutim bez dodatnih istraživanja se ne može sa sigurnošću tvrditi jesu li utvrđene razlike posljedica stanišnih i klimatskih uvjeta, faze odumiranja u kojoj se sastojina nalazi ili kombinacije jednog i drugog.

4.4 Osutost krošanja kao pokazatelj zdravstvenog stanja stabala

Pri motrenju oštećenosti šumskih ekosustava, koje se provodi u sklopu međunarodnog programa ICP Forests, procjenjuje se osutost krošanja stabala kao jedan od glavnih pokazatelja oštećenosti. Osim toga, U Republici Hrvatskoj je oštećenost (osutost) krošanja ključni kriterij po kojem se odumiruća stabla doznačuju za sječu, pri čemu se odumirućim stablima smatraju ona osutosti krošnje veće od 80 % (NN 17/2015), odnosno općenito gledajući, ona koja su pala ispod granice nepovratnog oštećenja i kod kojih je smrt neminovna kroz određeno vremensko razdoblje (Prpić 1992, Dobbertin i Brang 2001). Zbog navedenog je za potrebe ovog istraživanja osutost krošanja uzorkovanih stabala (procijenjena metodom prilagođenom prema ICP Forests programu) uzeta kao indikator cjelokupnog zdravstvenog stanja stabala, uključujući prizemni i podzemni dio, što je naposljetku i opravdano dobivenim rezultatima koji su pokazali kako postoji povezanost između pojave nekroza na korijenu i deblu i zdravstvene kategorije stabala određene na temelju osutosti krošnje. Navedeni rezultati su u skladu s istraživanjima koje su proveli Husson i sur. (2012) na običnom jasenu, gdje je utvrđena statistički značajna korelacija statusa krošnje i intenziteta nekroza baze debla, ali isključivo u sastojinama s jače izraženim simptomima odumiranja.

Na manjem broju individualno promatranih stabala poljskoga jasena nije utvrđena povezanost stanja krošnje i simptoma u korijenu i deblu. U slučaju izostanka nekroza na stablima umjerene i jake osutosti, navedeno može biti posljedica načina uzorkovanja, kojim nisu obuhvaćeni čitavi korijenov sustav niti donji dio debla, tako da postoji mogućnost kako simptomatično tkivo nije zahvaćeno prilikom uzimanja uzoraka unatoč tome što je uzorkovanje vršeno na onoj strani svijeta na kojoj se nalazio i oštećeni dio krošnje. Druga je mogućnost da je osutost krošnje nastupila kao posljedica privremenog djelovanja određenih abiotskih ili biotskih čimbenika, nakon čega bi se stabla teoretski mogla ponovno oporaviti. Dubravac i sur. (2011) također navode kako je potrebno razlikovati povećanje osutosti krošanja kroz određeni vremenski period kao prvi vidljivi simptom odumiranja stabala, te ono koje nastaje privremenim djelovanjem određenih čimbenika, posebice kod starijih stabala. U obrnutom slučaju, kada su unatoč zdravom izgledu krošnje pronađene nekroze u korijenu ili deblu, je vrlo vjerojatno slučaj o ranom razvoju simptoma koji se još nije odrazio na krošnji. Činjenica da je na jednome od takvih stabala izolirana patogena gljiva *Hymenoscyphus fraxineus* potkrijepljuje tezu koju navode Husson i sur. (2012), da se infekcije baze debla i krošnje odvijaju odvojeno.

4.5 Gljivama slični organizmi prisutni u tlu sastojina poljskog jasena sa simptomima odumiranja

Iako u prvom dijelu istraživanja koje je obuhvatilo 90 uzoraka tla u odumirućim sastojinama poljskoga jasena nije potvrđen utjecaj gljivama sličnih organizama na zdravstveno stanje stabala unatoč njihovoj visokoj zastupljenosti, dodatni uzorci su sakupljeni s ciljem detekcije patogenih vrsta roda *Phytophthora* koje se smatraju jednim od glavnih uzročnika odumiranja šumskog drveća u Europi (Jung i sur. 2013, Jankowiak i sur. 2014). Dosadašnja istraživanja gljivama sličnih organizama u Republici Hrvatskoj su također potvrdila prisutnost nekoliko vrsta roda *Phytophthora* u tlu i biljnom tkivu šumskih vrsta drveća narušenog zdravstvenog stanja (Županić 2004, Bakran i sur. 2009, Pernek i sur. 2011, Tomić i Ivić 2013), a neki ih autori smatraju jednim od čimbenika koji utječu na odumiranje običnog jasena (Orlikowski i sur. 2011) te čak i primarnim uzročnikom odumiranja poljskoga jasena (Akilli i sur. 2013b) na određenim lokacijama.

Iako su preliminarna istraživanja na uzorcima tla pomoću terenskih dijagnostičkih testova (eng. *Pocket diagnostic test*, Abingdon Health Ltd., UK) provedena u srpnju 2016. godine ukazala na prisutnost vrsta roda *Phytophthora* (Hegol 2016) u sastojinama poljskoga jasena, indirektne metode izolacije kombinirane s molekularnim metodama identifikacije vrste nisu potvrdile njihovu prisutnost (Kranjec i sur. 2017). Navedena činjenica ne umanjuje nužno vjerodostojnost terenskih testera, koji se i dalje mogu koristiti kao inicijalni pokazatelji prisutnosti vrsta roda *Phytophthora*, već može biti i posljedica manje zastupljenosti vrsta navedenog roda u tlu u odnosu na druge predstavnike gljivama sličnih organizama koji u kulturama micelija uzgojenim *in vitro* pokazuju brži rast te mogu znatno otežati identifikaciju sporije rastućih vrsta (Balcì i Halmschlager 2003b). Unatoč prethodno navedenim iznimkama (Orlikowski i sur. 2011), većina je sličnih istraživanja na običnom jasenu pokazala iste rezultate (Bakys i sur. 2009a, Schumacher i sur. 2010, Husson i sur. 2012), izostavljajući vrste roda *Phytophthora* kao biotske čimbenike koji bi mogli sudjelovati u procesu odumiranja običnog jasena u Europi te shodno tome i poljskoga jasena u nizinskim šumama Republike Hrvatske, iako kod potonjih postoje stanišni preduvjeti za njihovo širenje.

Od ostalih gljivama sličnih organizama koje su u prvom i drugom dijelu istraživanja izolirane iz 69 % i 80 % analiziranih uzoraka tla, su na svega šest uzoraka identificirane četiri različite vrste dvaju rodova, *Pythium* i *Phytopythium*. Dobiveni rezultati upućuju na njihovu visoku zastupljenost i raznolikost u ovoj ekološkoj niši, što ne iznenađuje s obzirom na činjenicu da se gljivama slični organizmi uglavnom šire zoosporama pokretljivim u vodi, a istraživane

lokacije obuhvaćaju često plavljena staništa. Pretpostavka je kako je zbog ograničenog broja uzoraka stvarna bioraznolikost gljivama sličnih organizama u tlu sastojina poljskoga jasena veća od dobivene ovim istraživanjem (Kranjec i sur. 2017).

Tri odabrana izolata dobivena iz uzoraka tla sakupljenih oko odumirućih stabala su identificirana kao *Phytopythium citrinum*, koja je do uspostave ovog novog roda (Bala i sur. 2010, de Cock i sur. 2015) bila poznata kao *Pythium citrinum* B. Paul, a pokazala se učestalom i u tlima sastojina hrasta lužnjaka narušenog zdravstvenog stanja te riječnim tokovima u Poljskoj (Jankowiak i sur. 2015, Matsiakh i sur. 2016). Vrste *Pythium lutarium* Ali-Shtayeh te *Phytopythium litorale* (Nechw.) Abad, De Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Lévesque, prije poznata kao *Pythium litorale* Nechw., koje su izolirane iz uzoraka tla sakupljenog oko zdravih stabala, dosad nisu potvrđene u tlima šumskih sastojina u sličnim istraživanjima provedenim u drugim europskim državama, već jedino u vodenim tokovima u Poljskoj (Matsiakh i sur. 2016). S obzirom da su ostala istraživanja obuhvatila isključivo sastojine hrasta lužnjaka, može se pretpostaviti kako vrste posjeduju sklonost prema određenim staništima i/ili šumskim zajednicama, iako su za potvrdu takvog zaključka potrebni dodatni dokazi, odnosno ispitivanja na većem broju uzoraka (Kranjec i sur. 2017). Vrsta *Pythium anandrum* Drechsler koja je potvrđena u uzorku tla sakupljenom oko zdravog stabla poljskog jasena se u većini europskih istraživanja provedenih u lužnjakovim sastojinama opisuje kao najobilnija vrsta roda *Pythium* u tlu s visokom učestalošću izolacije (Jung i sur. 2000, Balcì i Halmschlager 2003b, a, Jönsson i sur. 2003, Jankowiak i sur. 2015), a navodi se i kao mogući patogen hrasta kitnjaka (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.) u Turskoj na temelju visoke zastupljenosti u tlima odumirućih sastojina i razvoja nekroza u testovima patogenosti provedenim na trogodišnjim sadnicama (Akilli i sur. 2013a), te kao uzročnik odumiranja korijena na sadnicama obične smreke (*Picea abies* L. Karst) u rasadnicima u Norveškoj (Børja i sur. 2015).

Unatoč tome što su vrste rodova *Pythium* i *Phytopythium* vrlo česte u tlima odumirućih sastojina zajedno s vrstama roda *Phytophthora* (Jankowiak i sur. 2015) te su poznati patogeni određenih poljoprivrednih kultura i šumskih sadnica u rasadnicima (Weber i sur. 2004, Lévesque i sur. 2010), zasad nema sigurne potvrde o njihovoj povezanosti sa zdravstvenim stanjem šumskih sastojina, uključujući i one poljskoga jasena. Veća je vjerojatnost kako su u tlima odumirućih sastojina prisutne u velikom broju kao saprotrofi kojima odgovaraju stanišni uvjeti nizinskih šuma.

5. ZAKLJUČCI

⇒ Metodološki slično istraživanje zajednica gljiva i njima sličnih organizama u biljnom tkivu stabala i tlu odumirućih sastojina poljskoga jasena dosad nije provedeno izvan Republike Hrvatske, stoga ovo istraživanje daje dosad najekstenzivniji pregled taksona gljiva i gljivama sličnih organizama na poljskom jasenu u Europi.

⇒ Na korijenovom sustavu i bazi debla te okolnom tlu u odumirućim sastojinama poljskoga jasena u Gornjoj Posavini zabilježena je znakovita bioraznolikost gljiva i gljivama sličnih organizama. Utvrđeno je 80 taksona među kojima je 59 identificirano do razine vrste. Postoji visoka zastupljenost i raznolikost vrsta, pri čemu brojnošću jedinki prevladava manji broj dominantnih taksona, poput *Trichoderma* spp., *Pythium/Phytopythium* spp., *Ilyonectria robusta*, *Absidia* sp., *Fusarium solani*, *Cladosporium cladosporioides*, *Diaporthe cotoneastri*, *Clonostachys rosea*, *Penicillium ochrocloron*, *Armillaria* spp., *Talaromyces ucrainicus*, *Coprinellus micaceus*, *Talaromyces verruculosus*, *Ganoderma adspersum* i *Hymenoscyphus fraxineus*, dok su preostali taksoni zastupljeni s manjim brojem jedinki.

⇒ U tlu te na korijenovom sustavu i bazi debla stabala poljskoga jasena u odumirućim sastojinama na istraživanim lokacijama je utvrđeno 39 vrsta za koje se prema dostupnoj literaturi može pretpostaviti kako su prvi put zabilježene u Republici Hrvatskoj te 21 takson koji je identificiran do taksonomske razine roda, porodice, reda ili pododjela te potencijalno predstavlja nove vrste za znanost.

⇒ U odumirućim sastojinama poljskoga jasena su, ukupno gledajući, po broju jedinki podjednako zastupljeni taksoni gljiva i gljivama sličnih organizama koji prema načinu života i ishrane pripadaju endofitima, saprotrofima i parazitima. Vrste mikoriznih gljiva vrlo vjerojatno nisu utvrđene zbog primijenjenih metoda uzorkovanja, izolacije i identifikacije.

⇒ Distribucija utvrđenih taksona gljiva i njima sličnih organizama s obzirom na različite kategorije uzorka ukazuje na specijalizaciju većeg broja taksona za određeni tip biljnog tkiva ili supstrata, primjerice taksona *Armillaria* spp., *Hymenoscyphus fraxineus* i *Coprinellus micaceus* za tkivo debla i korijena te taksona *Pythium/Phytopythium* spp., *Purpureocillium lilacinum* i *Metarhizium marquandii* za tlo, dok na stablima različitog zdravstvenog stanja te na različitim geografskim lokacijama uzorkovanja dolaze

zajednice relativno slične taksonomske kompozicije na što ukazuju dobivene vrijednosti Sørensenovih indeksa sličnosti.

⇒ Raznolikost, odnosno bogatstvo vrsta zajednica gljiva i njima sličnih organizama u pojedinim kategorijama uzorka (deblo, korijen, tlo) se statistički značajno ne mijenja promjenom zdravstvenog stanja stabla na svim istraživanim lokacijama.

⇒ Iako se i na poljskom i na običnom jasenu javljaju zajedničke vrste gljiva od kojih neke mogu imati važnu ili čak i presudnu ulogu u njihovom odumiranju (*Hymenoscyphus fraxineus*, *Armillaria* spp., *Ganoderma adspersum*, *Psathyrella candolleana*, *Metapochonia bulbillosa*, *Pseudeurotium bakeri*, *Coprinellus disseminatus*, *Nemania serpens*, *Gibberella baccata*, *Cladosporium cladosporioides*, *Epicoccum nigrum*, *Fusarium lateritium* i *Fusarium solani*), 53 vrste utvrđene u ovom istraživanju nisu dosad potvrđene i na običnom jasenu, ukazujući na to da vrste gljiva i njima sličnih organizama koji kao biotički čimbenici sudjeluju u navedenom procesu nisu potpuno jednake za navedene biljne vrste, odnosno postoje razlike u čimbenicima koji utječu na odumiranje poljskog i običnog jasena.

⇒ Osim taksona *Armillaria* spp. i *Coprinellus disseminatus* u deblu te *Cladosporium cladoporioides* u tlu, distribucija preostalih 77 taksona gljiva i njima sličnih organizama u tlu te korijenu i bazi debla stabala različitog zdravstvenog stanja je statistički jednaka, odnosno taksoni prisutni u prizemnim i podzemnim dijelovima zdravih stabala poljskoga jasena su u pravilu ujedno i primarni kolonizatori stabala narušenog zdravstvenog stanja i/ili odumirućih stabala. Pritom uloga taksona kategoriziranih kao endofiti ostaje nerazjašnjena jer nije poznato ispoljavaju li nakon promjene metabolizma i/ili pada vitaliteta domaćina saprotrofni i/ili parazitski način života, dok se za taksone koji su u literaturi kategorizirani kao saprotrofi pretpostavlja da i na poljskom jasenu imaju ulogu razlaganja mrtvog tkiva u odumirućim i stablima narušenog zdravstvenog stanja.

⇒ Jedanaest taksona utvrđenih u korijenu i deblu poljskoga jasena prema dostupnoj literaturi može ispoljavati parazitski način života, pri čemu pet najučestalijih u kumulativnom i sinergijskom djelovanju značajnije utječu na odumiranje stabala u svojstvu patogena za čiju infekciju nije potrebna predispozicija domaćina (*Hymenoscyphus fraxineus*) ili oportunističkih patogena koji parazitski način života razvijaju nakon promjene metabolizma i/ili pada vitaliteta domaćina (*Fusarium solani,*

Diaporthe cotoneastri, Armillaria spp., *Ganoderma adspersum*), dok preostalih šest taksona, iako mogu živjeti parazitski, zbog male brojnosti i/ili poznate biologije, najvjerojatnije nemaju značajnu ulogu u odumiranju poljskoga jasena na istraživanima lokacijama.

⇒ Gljivama slični organizmi rodova *Pythium* i *Phytopythium*, u literaturi opisani kao paraziti određenih poljoprivrednih kultura i šumskih sadnica u rasadnicima, su u statistički jednakoj mjeri pronađeni u tlu oko stabala svih zdravstvenih kategorija te nisu izolirani iz biljnog tkiva, stoga nemaju neposredan utjecaj na odumiranje poljskoga jasena na istraživanim lokacijama.

⇒ Gljiva *Fusarium solani*, poznata kao parazit rana i/ili slabosti koji kod više vrsta drveća može uzrokovati trulež korijena, rak debla i odumiranje krošnji, na stablima poljskoga jasena u statistički jednakoj mjeri pridolazi u različitim kategorijama zdravstvenog stanja, pri čemu je u korijenu i deblu stabala druge zdravstvene kategorije (umjerene osutosti krošnje) zastupljena s relativno većim brojem izolata u odnosu na preostale dvije. Iz navedenog proizlazi mogućnost njenog sudjelovanja u odumiranju poljskoga jasena u svojstvu slabog parazita na stablima promijenjenog metabolizma i/ili narušenog vitaliteta.

⇒ Gljiva *Diaporthe cotoneastri*, koja se prema nekim autorima može poistovjetiti s vrstom *Diaporthe eres*, u odumiranju poljskoga jasena vrlo vjerojatno sudjeluje kao slabi oportunistički parazit u ranijim fazama odumiranja te u manjem broju u odnosu na ostale često utvrđene parazitske taksone, jer iako se u literaturi navodi kao uzročnik nekrotičnih lezija, raka debla i odumiranja izbojaka i mladih biljaka drvenastih vrsta te je i na poljskom jasenu utvrđena u simptomatičnom tkivu korijena i debla, njena se učestalost smanjuje pogoršanjem zdravstvenog stanja stabala.

⇒ Vrste roda *Armillaria*, od kojih je molekularnim metodama potvrđena *Armillaria cepistipes* u Novskoj, su zabilježene isključivo u simptomatičnom biljnom tkivu te, osim jedne iznimke, na stablima značajne osutosti krošnje (>25 %). Na lokacijama u Novskoj i Dugom Selu sudjeluju u odumiranju poljskoga jasena kao sekundarni čimbenici koji inficiraju korijen i donji dio debla stabala narušena vitaliteta.

⇒ Patogena gljiva *Hymenoscyphus fraxineus* je, osim u krošnji i gornjem dijelu debla, što je potvrđeno ranijim istraživanjima, prisutna i na korijenovom sustavu i bazi debla manjeg broja stabala poljskoga jasena na lokacijama u Lipovljanima i Dugom Selu, pri

čemu uglavnom dolazi na stablima značajne osutosti krošnje (>25 %) te isključivo u simptomatičnom tkivu, što potvrđuje njenu važnu patogenu ulogu u odumiranju poljskoga jasena.

⇒ Gljiva *Ganoderma adspersum* je u odumirućim sastojinama poljskoga jasena u statistički jednakoj mjeri prisutna u deblu, korijenu i okolnom tlu stabala različitih kategorija zdravstvenog stanja, ali relativno češće pridolazi u biljnom tkivu stabala umjerene osutosti krošnje (druga zdravstvena kategorija). Na temelju navedene distribucije te činjenice kako je u literaturi opisana kao fakultativni parazit i uzročnik bijele truleži korijena i baze debla živih stabala čijoj progresiji pogoduju određeni predisponirajući čimbenici, može se pretpostaviti kako *Ganoderma adspersum* na stablima narušenog zdravstvenog stanja može ovisno o fiziološkom statusu tkiva ispoljavati i parazitski i saprotrofni način života.

⇒ Unatoč rezultatima Fisherovog egzaktnog testa koji ukazuju na statistički značajno različitu distribuciju vrste *Cladosporium cladosporioides* u okolnom tlu stabala različitih zdravstvenih kategorija, zbog primarno saprotrofne uloge opisane u literaturi te malog broja jedinki utvrđenih u navedenom supstratu se ne može zaključiti kako prisutnost ove vrste u tlu ima značajan utjecaj na zdravstveno stanje poljskoga jasena.

⇒ Statistički značajna razlika u distribuciji vrste *Coprinellus disseminatus* na deblima stabala različitih kategorija zdravstvenog stanja je odraz svega četiri izolata dobivenih iz debla, koji su nađeni isključivo na vizualno zdravom tkivu četiri stabla prve zdravstvene kategorije, stoga ne upućuje na njenu izraženu ulogu u odumiranju poljskoga jasena.

⇒ Unatoč relativno visokim indeksima sličnosti taksonomske kompozicije zajednica gljiva i njima sličnih organizama između različitih geografskih lokacija uzorkovanja, postoji statistički značajna razlika u distribuciji taksona *Diaporthe cotoneastri*, *Penicillium* sp. 1 i *Nemania serpens* u deblu, taksona *Absidia* sp., *Cladosporium cladosporioides*, *Armillaria* spp., *Ganoderma adspersum*, *Coprinellus micaceus* i *Trichoderma* spp. u korijenu, te taksona *Gibberella fujikuroi* i *Fusarium solani* u okolnom tlu stabala između tri lokacije obuhvaćene istraživanjem. Navedeno može biti posljedica različitih mikrostanišnih i mikroklimatskih uvjeta koji vladaju u biljnom tkivu debla i korijena ili u tlu na različitim lokacijama ili označavati različite sukcesijske faze odumiranja u kojima se sastojine nalaze.

⇒ Postoji statistički značajna povezanost između pojave simptoma (diskoloracije i nekroze) na korijenu i deblu i zdravstvene kategorije stabala određene na temelju osutosti krošnje, odnosno broj stabala s prisutnim simptomima raste povećanjem osutosti krošnje, s 13 stabala u prvoj, na njih 49 u drugoj te 55 u trećoj zdravstvenoj kategoriji, dakle navedeni se parametar može koristiti kao dobar pokazatelj zdravstvenog stanja prizemnih i podzemnih dijelova stabala poljskoga jasena zahvaćenog odumiranjem.

⇒ Na biljnom tkivu poljskoga jasena nisu utvrđeni gljivama slični organizmi, te identifikacijom vrsta u tlu odumirućih sastojina na istraživanim lokacijama nije potvrđena prisutnost roda *Phytophthora*, zbog čega se do daljnjih istraživanja ove vrste mogu isključiti kao jedan od mogućih čimbenika u kumulativnom i sinergijskom djelovanju na odumiranje poljskoga jasena.

⇒ Provedenim istraživanjem u sastojinama poljskog jasena sa simptomima odumiranja od ukupno izoliranih taksona 31 % pripada parazitskim vrstama. Među njima dominantno (86 %) prisutno je pet vrsta: *Hymenoscyphus fraxineus*, *Fusarium solani*, *Diaporthe cotoneastri, Armillaria* spp. i *Ganoderma adspersum*. Navedeni patogeni organizmi utvrđeni su u svim zdravstvenim kategorijama i njihovi nalazi upućuju na zaključak da u procesima odumiranja poljskog jasena imaju značajan utjecaj na zdravstveno stanje stabala, pretpostavljeno u sinergiji s drugim abiotičkim i/ili biotičkim čimbenicima. Uloga taksona kategoriziranih kao endofiti ostaje još nerazjašnjena s obzirom da nije poznato ispoljavaju li nakon promjene metabolizma i/ili pada vitaliteta jasenovih stabla saprotrofni i/ili parazitski način života. Buduća istraživanja trebala bi razjasniti i njihovu ulogu u fenomenu odumiranja poljskoga jasena u Republici Hrvatskoj.

LITERATURA

1) Anon., 2009: Osnova gospodarenja za gospodarsku jedinicu "Črnovščak" za razdoblje od 1.1.2009.-31.12.2018. godine, Hrvatske šume d.o.o., Zagreb, Hrvatska.

2) Anon., 2011: Osnova gospodarenja za gospodarsku jedinicu "Trstika" za razdoblje od 1.1.2011.-31.12.2021. godine, Hrvatske šume d.o.o., Zagreb, Hrvatska.

3) Anon., 2015: Osnova gospodarenja za gospodarsku jedinicu "Josip Kozarac" za razdoblje od 1.1.2015.-31.12.2024. godine, Hrvatske šume d.o.o., Zagreb, Hrvatska.

4) Anon., 2015: Pravilnik o doznaci stabala, obilježavanju drvnih sortimenata, popratnici i šumskom redu. Narodne novine 17/2015, 13.2.2015.

5) Abreo, E., Martínez, S., Sessa, L., Bettucci, L., Lupo, S., 2012: *Phomopsis cotoneastri* as a Pathogen Associated with Trunk Cankers and Death of Young Apple Trees cv. Cripps Pink. Journal of Phytopathology 160 (7-8): 434-436.

6) Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Lane, C. E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S. S., Brown, M. W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., le Gall, L., Lynn, D. H., McManus, H., Mitchell, E. A. D., Mozley-Stanridge, S. E., Parfrey, L. W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, L., Schoch, C. L., Smirnov, A., Spiegel, F. W., 2012: The Revised Classification of Eukaryotes. Journal of Eukaryotic Microbiology 59 (5): 429-514.

7) Akilli, S., Ulubaş Serçe, Ç., Katircioğlu, Y. Z., Maden, S., 2013a: Does *Pythium anandrum* contribute to the dieback of sessile oak (*Quercus petraea*) in Turkey? Forest Pathology 43 (6): 505-508.

8) Akilli, S., Ulubaş Serçe, Ç., Katircioğlu, Y. Z., Maden, S., 2013b: *Phytophthora* dieback on narrow leaved ash in the Black Sea region of Turkey. Forest Pathology 43 (3): 252-256.

9) Alexopoulos, C. J., Mims, C. W., Blackwell, M., 1996: Introductory Mycology. John Wiley and Sons Inc., New York, USA, 1-880.

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

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

12) Anderson, O. R., Cavalier-Smith, T., 2012: Ultrastructure of *Diplophrys parva*, a New Small Freshwater Species, and a Revised Analysis of *Labyrinthulea* (*Heterokonta*). Acta Protozoologica 51: 291-304.

13) Androić, M., 1975: Prethodni rezultati timskog istraživanja uzroka sušenja hrasta u slavonskim šumama. Sto godina znanstvenog i organiziranog pristupa šumarstvu jugoistočne Slavonije, Slavonski Brod/Vinkovci, 59-78.

14) Anić, I., 1996: Pomlađivanje i razvoj sastojina poljskog jasena (*Fraxinus angustifolia* Vahl) u središnjoj Hrvatskoj. Magistarski rad, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 1-140.

15) Anić, I., 2001: Uspijevanje i pomlađivanje sastojina poljskog jasena (*Fraxinus angustifolia* Vahl) u Posavini. Doktorski rad, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 1-197.

16) Arhipova, N., Gaitnieks, T., Donis, J., Stenlid, J., Vasaitis, R., 2011: Decay, yield loss and associated fungi in stands of grey alder (*Alnus incana*) in Latvia. Forestry: an International Journal of Forest Research 84 (4): 337-348.

17) Bađun, S., 1960: Utjecaj modrenja na tehnička svojstva drva. Šumarski list 84 (11-12): 357-367.

18) Bae, H., Sicher, R. C., Kim, M. S., Kim, S.-H., Strem, M. D., Melnick, R. L., Bailey, B. A., 2009: The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. Journal of Experimental Botany 60 (11): 3279-3295.

19) Bakran, Ž., Šušnjić, V., Pernek, M., 2009: Pojava pseudogljive *Phytophthora* sp. na Bilogori i njen utjecaj na sušenje bukve. 53. Seminar biljne zaštite, Opatija, Hrvatska.

20) Bakys, R., Vasiliauskas, R., Barklund, P., Ihrmark, K., Stenlid, J., 2006: Fungal attacks to root systems and crowns of declining *Fraxinus excelsior*. Aktuelt fra skogforskningen 1-06: 71-72.

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

22) Bakys, R., Vasaitis, R., Barklund, P., Thomsen, I. M., Stenlid, J., 2009b: Occurrence and pathogenicity of fungi in necrotic and non-symptomatic shoots of declining common ash (*Fraxinus excelsior*) in Sweden. European Journal of Forest Research 128: 51-60.

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

24) Bala, K., Robideau, G. P., Levésque, C. A., de Cock, A. W., Abad, Z. G., Lodhi, A. M., Shahzad, S., Ghaffar, A., Coffey, M. D., 2010: *Phytopythium* Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Lévesque, gen. nov. and *Phytopythium sindhum* Lodhi, Shahzad & Lévesque, sp. nov. Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi 24: 136-137.

25) Balcì, Y., Halmschlager, E., 2003a: *Phytophthora* species in oak ecosystems in Turkey and their association with declining oak trees. Plant Pathology 52 (6): 694-702.

26) Balcì, Y., Halmschlager, E., 2003b: Incidence of *Phytophthora* species in oak forests in Austria and their possible involvement in oak decline. Forest Pathology 33 (3): 157-174.

27) Balestrini, R., Lumini, E., Borriello, R., Bianciotto, V., 2015: Plant-Soil Biota Interactions. Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry, Academic Press, Boston, 311-338.

28) Banik, M. T., Lindner, D. L., Juzwik, J., Glaeser, J. A., 2012: Development of a DNA Sampling Kit to Detect Pathogenic, Saprotrophic, and Stain Fungi in Sapwood of Declining

Red Pine (*Pinus resinosa*) in The Upper Midwest. 60th Annual Western International Forest Disease Work Conference, Tahoe City, USA, 101-110.

29) Baral, H.-O., Queloz, V., Hosoya, T., 2014: *Hymenoscyphus fraxineus*, the correct scientific name for the fungus causing ash dieback in Europe. IMA Fungus 5 (1): 79-80.

30) Barić, L., Diminić, D., 2010: Prvi nalaz patogene gljive *Chalara fraxinea* Kowalski na bijelom jasenu (*Fraxinus excelsior* L.) u Gorskom kotaru. 54. Seminar biljne zaštite, Opatija, Hrvatska, 33-33.

31) Beakes, G. W., Honda, D., Thines, M., 2014: Systematics of the *Straminipila*: *Labyrinthulomycota*, *Hyphochytriomycota*, and *Oomycota*. Systematics and Evolution, Part A, Springer, 39-97.

32) Begerow, D., Nilsson, H., Unterseher, M., Maier, W., 2010: Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. Applied Microbiology and Biotechnology 87 (1): 99-108.

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

34) Beug, M., Bessette, A. E., Bessette, A. R., 2014: Ascomycete Fungi of North America: a Mushroom Reference Guide. University of Texas Press, 1-502.

35) Bisen, K., Keswani, C., Mishra, S., Saxena, A., Rakshit, A., Singh, H. B., 2015: Unrealized potential of seed biopriming for versatile agriculture. Nutrient Use Efficiency: from Basics to Advances, Springer, 193-206.

36) Blackwell, M., 2011: The fungi: 1, 2, 3 … 5.1 million species? American Journal of Botany 98 (3): 426-438.

37) Boddy, L., Frankland, J., van West, P., 2007: Ecology of Saprotrophic Basidiomycetes. Academic Press, London, UK, 1-386.

38) Bogdan, S., Kajba, D., Franjić, J., Marilena, I., Škvorc, Ž., Katičić Bogdan, I., 2007: Genetic variation in quantitative traits within and among Croatian narrow-leaved ash (*Fraxinus angustifolia* Vahl) populations assessed in an open-pollinated progeny test. Periodicum Biologorum 109: 1-11.

39) Børja, I., Nagy, N. E., Brurberg, M. B., Sundheim, L., Herrero, M.-L., 2015: Pathogenicity of Norwegian isolates of *Pythium undulatum* and *Pythium anandrum* on Norway spruce seedlings. Agarica 36: 5-10.

40) Brasier, C. M., 1992: Oak tree mortality in Iberia. Nature 360 (6404): 539-539.

41) Brasier, C. M., 1996: Low Genetic Diversity of the *Ophiostoma novo-ulmi* Population in North America. Mycologia 88 (6): 951-964.

42) Brasier, C. M., Jung, T., 2004: Recent developments in *Phytophthora* diseases of trees and natural ecosystems in Europe. Third Intenational IUFRO Working Party, Freising, Germany, 5-16.

43) Brundrett, M. C., Abbott, L. K., 2002: Arbuscular mycorrhizas in plant communities. Microorganisms in Plant Conservation and Biodiversity, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 151-193.

44) Brundrett, M. C., Cairney, J., 2002: Ectomycorrhizas in plant communities. Microorganisms in Plant Conservation and Biodiversity, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 105-150.

45) Brundrett, M. C., 2004: Diversity and classification of mycorrhizal associations. Biological Reviews 79: 473-495.

46) Bruvo Mađarić, B., 2007: Određivanje količine i kakvoće DNA spektrofotometrijom. Metode u molekularnoj biologiji, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska, 199-200.

47) Buzas, M. A., Gibson, T. G., 1969: Species Diversity: Benthonic Foraminifera in Western North Atlantic. Science 163 (3862): 72-75.

48) Cabral, A., Groenewald, J. Z., Rego, C., Oliveira, H., Crous, P. W., 2012: *Cylindrocarpon* root rot: multi-gene analysis reveals novel species within the *Ilyonectria radicicola* species-complex. Mycological Progress 11: 655-688.

49) Campbell, W. A., Hendrix, F. F., Powell, W. M., 1972: *Pythium* and nematode species implicated in root rot. Tree Planters' Notes 23 (1): 5-7.

50) Carlile, M. J., Watkinson, S. C., 1994: The Fungi. Academic Press Limited, London, UK, 1-482.

51) Carroll, G., 1988: Fungal Endophytes in Stems and Leaves: From Latent Pathogen to Mutualistic Symbiont. Ecology 69 (1): 2-9.

52) Castillo Lopez, D., Zhu-Salzman, K., Ek-Ramos, M. J., Sword, G. A., 2014: The Entomopathogenic Fungal Endophytes *Purpureocillium lilacinum* (Formerly *Paecilomyces lilacinus*) and *Beauveria bassiana* Negatively Affect Cotton Aphid Reproduction under Both Greenhouse and Field Conditions. PLoS ONE 9 (8): 1-8.

53) Cavalier-Smith, T., Chao, E. E. Y., 2006: Phylogeny and megasystematics of phagotrophic heterokonts (Kingdom *Chromista*). Journal of Molecular Evolution 62 (4): 388-420.

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

55) Chen, C., Verkley, G. J. M., Sun, G., Groenewald, J. Z., Crous, P. W., 2016: Redefining common endophytes and plant pathogens in *Neofabraea, Pezicula*, and related genera. Fungal Biology 120 (11): 1291-1322.

56) Chen, J., 2012: Fungal Community Survey of *Fraxinus excelsior* in New Zealand. Master Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, 1-33.

57) Coates, K. D., 1987: Effects of shrubs and herbs on conifer regeneration and microclimate in the Rhododendron-Vaccinium-Menziesia community of south-central British Columbia. Master Thesis, Oregon State University, USA, 1-103.

58) Coleman, J. J., 2016: The *Fusarium solani* species complex: ubiquitous pathogens of agricultural importance. Molecular Plant Pathology 17 (2): 146-158.

59) Colwell, R. K., 2013: EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 9. User's Guide and application published at: http://purl.oclc.org/estimates.

60) Cooke, D. E. L., Drenth, A., Duncan, J. M., Wagels, G., Brasier, C. M., 2000: A Molecular Phylogeny of *Phytophthora* and Related *Oomycetes*. Fungal Genetics and Biology 30 (1): 17-32.

61) Cooke, R. C., Rayner, A. D. M., 1984: Ecology of saprotrophic fungi. Longman, London, UK, 1-438.

62) Cooke, R. C., Whipps, J. M., 1993: Ecophysiology of fungi. Blackwell, Oxford, UK, 1-348.

63) Crawford, R. H., Carpenter, S. E., Harmon, M. E., 1990: Communities of Filamentous Fungi and Yeast in Decomposing Logs of *Pseudotsuga menziesii*. Mycologia 82 (6): 759-765.

64) Crous, P. W., Braun, U., Schubert, K., Groenewald, J. Z., 2007: Delimiting *Cladosporium* from morphologically similar genera. Studies in Mycology 58: 33-56.

65) Crowther, T. W., Boddy, L., Hefin Jones, T., 2012: Functional and ecological consequences of saprotrophic fungus–grazer interactions. The ISME Journal 6 (11): 1992-2001.

66) Cvjetković, B., 2014: Upravljanje rizikom od mikotoksina počinje u polju. Glasilo biljne zaštite 14 (4): 317-328.

67) Čavlović, J., 2010: Prva nacionalna inventura šuma Republike Hrvatske. Ministarstvo regionalnog razvoja šumarstva i vodnoga gospodarstva i Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska, 1-300.

68) Čukman, I., 1990: Zaštita tekstilnih predmeta. Informatica museologica 21 (3-4): 33-34.

69) Ćosić, J., Vrandečić, K., Jurković, D., Ereš, I., Poštić, J., 2008: Parazitna mikopopulacija zrna soje. Poljoprivreda, 14 (1): 5-8.

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

71) De Bary, A., 1879: Die Erscheinung der Symbiose. Vortrag auf der Versammlung der Naturforscher und Ärtze zu Cassel, Verlag, Strassburg, Germany, 1-30.

72) de Cock, A. W., Lodhi, A. M., Rintoul, T. L., Bala, K., Robideau, G. P., Abad, Z. G., Coffey, M. D., Shahzad, S., Lévesque, C. A., 2015: *Phytopythium*: molecular phylogeny and systematics. Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi 34: 25-39.

73) De Simone, D., Annesi, T., 2012: Occurrence of *Ganoderma adspersum* on *Pinus pinea*. Phytopathologia Mediterranea 51 (2): 374-382.

74) Deacon, J. W., 2013: Fungal Biology. John Wiley & Sons Inc., New York, USA, 1-384.

75) Dekanić, I., 1972: Utvrđivanje najpogodnijih vrsta drveća i metoda obnove opustošenih površina sušenjem hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.). Šumarski List 99 (4-6): 119-127.

76) Demirci, F., Maden, S., 2006: A severe dieback of box elder (*Acer negundo*) caused by *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. in Turkey. Australasian Plant Disease Notes 1: 13-15.

77) Desprez-Loustau, M.-L., Marçais, B., Nageleisen, L.-M., Piou, D., Vannini, A., 2006: Interactive effects of drought and pathogens in forest trees. Annals of Forest Science 63 (6): 597-612.

78) Dhingra, O. D., Mizubuti, E. S. G., Napoleao, I. T., Jham, G., 2001: Free fatty acid accumulation and quality loss of stored soybean seeds invaded by *Aspergillus ruber*. Seed science and technology 29 (1): 193-203.

79) Dick, M. W., 1997: Fungi, flagella and phylogeny. Mycological Research 101: 385-394.

80) Dick, M. W., 2001: Straminipilous Fungi: Systematics of the *Peronosporomycetes* Including Accounts of the Marine Straminipilous Protists, the Plasmodiophorids and Similar Organisms. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 1-670.

81) Dickie, I. A., Xu, B., Koide, R. T., 2002: Vertical niche differentiation of ectomycorrhizal hyphae in soil as shown by T-RFLP analysis. New Phytologist 156: 527-535.

82) Diminić, D., Kajba, D., Bezjak, J., 2002: Gljive uzročnici hipertrofija i rak-rana na topolama u klonskom arhivu "Podturen". Radovi Šumarskog instituta Jastrebarsko 37 (2): 169-183.

83) Diminić, D., 2005: Mikoze kore i lišća topola i vrba. Poplavne šume u Hrvatskoj. Akademija šumarskih znanosti, Zagreb, Hrvatska, 390-397.

84) Diminić, D., 2015: Nova bolest jasena (*Fraxinus* spp.) u Hrvatskoj. Proizvodnja hrane i šumarstvo - temelj razvoja istočne Hrvatske, Vinkovci, Hrvatska, 363-373.

85) Diminić, D., Kajba, D., Milotić, M., Andrić, I., Kranjec, J., 2017: Susceptibility of *Fraxinus angustifolia* Clones to *Hymenoscyphus fraxineus* in Lowland Croatia. Baltic Forestry 23 (1): 233-243.

86) Dobbertin, M., Brang, P., 2001: Crown defoliation improves tree mortality models. Forest Ecology and Management 141 (3): 271-284.

87) dos Santos, R. F., Blume, E., da Silva, G. B. P., Lazarotto, M., Scheeren, L. E., Zini, P. B., Bastos, B. O., Rego, C., 2013: First Report of *Ilyonectria robusta* Associated with Black Foot Disease of Grapevine in Southern Brazil. Plant Disease 98 (6): 845-845.

88) Drenth, A., Sendall, B., 2001: Practical guide to detection and identification of *Phytophthora*. CRC for Tropical Plant Protection, Brisbane, Australia, 1-41.

89) Dubravac, T., Dekanić, S., Roth, V., 2011: Dinamika oštećenosti i struktura krošanja stabala hrasta lužnjaka u šumskim zajednicama na gredi i u nizi - rezultati motrenja na trajnim pokusnim plohama. Šumarski List (13): 74-89.

90) Durães, S., 2015: Pathogenicity tests of *Phytophthora alni* and *Phytophthora plurivora* in *Fraxinus excelsior* and *Alnus glutinosa* seedlings. Master Thesis, University of Valladolid, Palencia, Spain, 1-69.

91) Ebead, G. A., Overy, D. P., Berrué, F., Kerr, R. G., 2012: *Westerdykella reniformis* sp. nov., producing the antibiotic metabolites melinacidin IV and chetracin B. IMA Fungus 3 (2): 189-201.

92) El-Hassan, S. A., Gowen, S. R., Pembroke, B., 2013: Use of *Trichoderma hamatum* for biocontrol of lentil vascular wilt disease: efficacy, mechanisms of interaction and future prospects. Journal of Plant Protection Research 53 (1): 12-26.

93) Elad, Y., Chet, I., Henis, Y., 1982: Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. Canadian Journal of Microbiology 28 (7): 719-725.

94) Enderle, R., Peters, F., Nakou, A., Metzler, B., 2013: Temporal development of ash dieback symptoms and spatial distribution of collar rots in a provenance trial of *Fraxinus excelsior*. European journal of forest research 132 (5-6): 865-876.

95) Enderle, R., Sander, F., Metzler, B., 2017: Temporal development of collar necroses and butt rot in association with ash dieback. iForest - Biogeosciences and Forestry 10 (3): 529-536.

96) Entry, J., Martin, N., Cromack, K., Stafford, S., 1986: Light and nutrient limitation in *Pinus monticola*: seedling susceptibility to *Armillaria* infection. Forest Ecology and Management 17 (2-3): 189-198.

97) Eshel, A., Beeckman, T., 2013: Plant Roots: The Hidden Half. Taylor & Francis CRC Press, Boca Raton, USA, 1-848.

98) Evans, H. C., Holmes, K. A., Thomas, S. E., 2003: Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. Mycological Progress 2 (2): 149-160.

99) Fink, S., 1999: Pathological and regenerative plant anatomy. Gebruder Borntraeger, Germany, 1-1095.

100) FRAXIGEN, 2005: Ash Species in Europe: Biological Characteristics and Practical Guidelines for Sustainable Use. Oxford Forestry Institute, University of Oxford, UK, 1-128.

101) Freeman, S., Rodriguez, R. J., 1993: Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualist. Science 260 (5104): 75-8.

102) Fukarek, P., 1952: Poljski jasen (*Fraxinus angustifolia* Vahl)-njegove osobine, rasprostranjenje i šumarsko značenje. Doktorski rad, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 1-277.

103) Fukarek, P., 1954: Poljski jasen (*Fraxinus angustifolia* Vahl). Šumarski List 78 (9-10): 433-453.

104) Fukarek, P., 1955: Poljski jasen (*Fraxinus angustifolia* Vahl) i neke njegove šumsko uzgojne osobine. Šumarstvo (6/7): 331-343.

105) Fukarek, P., 1956: Prilog poznavanju šumskih zajednica u kojima se javlja poljski jasen (*Fraxinus angustifolia* Vahl). Šumarski List 80 (1-2): 30-39.

106) Fukarek, P., 1957: Novi podaci o poljskom jasenu (*Fraxinus angustifolia* Vahl). Šumarski List 81 (1-2): 30-35.

107) Gáperová, S., Náplavová, K., Gáper, J., 2015: Ectomycorrhizal and saprotrophic macrofungi associated with woody plants in the Borova hora arboretum. Thaiszia Journal of Botany 25 (1): 163-170.

108) Garbelotto, M., 2004: Sudden oak death: a tale of two continents. Outlooks on Pest Management 15 (2): 85.

109) Gazis, R., Skaltsas, D., Chaverri, P., 2014: Novel endophytic lineages of *Tolypocladium* provide new insights into the ecology and evolution of *Cordyceps*-like fungi. Mycologia 106 (6): 1090-1105.

110) Gennaro, M., Gonthier, P., Nicolotti, G., 2003: Fungal Endophytic Communities in Healthy and Declining *Quercus robur* L. and *Q. cerris* L. Trees in Northern Italy. Journal of Phytopathology 151 (10): 529-534.

111) Gerard, P. R., Fernandez-Manjarres, J. F., Frascaria-Lacoste, N., 2006: Temporal cline in a hybrid zone population between *Fraxinus excelsior* L. and *Fraxinus angustifolia* Vahl. Molecular Ecology 15 (12): 3655-3667.

112) Gilbert, G., Reynolds, D. R., 2002: The ecology of foliicolous fungi. 7th International mycological congress, Oslo, Norway, 89-89.

113) Gilbert, G., Reynolds, D. R., 2005: Epifoliar fungi from Queensland, Australia. Australian Systematic Botany 18: 265-289.

114) Ginting, R. C. B., Sukarno, N., Widyastuti, U., Darusman, L. K., Kanaya, S., 2013: Diversity of Endophytic Fungi from Red Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) Plant and Their Inhibitory Effect to *Fusarium oxysporum* Plant Pathogenic Fungi. HAYATI Journal of Biosciences 20 (3): 127-137.

115) Giordano, L., Gonthier, P., Varese, G. C., Miserere, L., Nicolotti, G., 2009: Mycobiota inhabiting sapwood of healthy and declining Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) trees in the Alps. Fungal Diversity 38: 69-83.

116) Girivasan, K. P., Suryanarayanan, T. S., 2004: Intact leaves as substrate for fungi: distrubution of endophytes and phylloplane fungi in rattan palms. Czech Mycology 56: 33-43.

117) Girlanda, M., Varese, G. C., Luppi Mosca, A. M., 1995: In vitro interactions between saprotrophic microfungi and ectomycorrhizal symbionts. Allionia (Turin) 33: 81-86.

118) Glavač, V., 1959: O šumi poljskog jasena s kasnim drijemovcem (*Leucoieto-Fraxinetum angustifoliae* ass. nova). Šumarski List 83 (1-3): 39-45.

119) Gönczöl, J., Révay, Á., 2003: Treehole fungal communities: aquatic, aero-aquatic and dematiaceous hyphomycetes. Fungal Diversity 12: 19-34.

120) Gračan, J., Krstinić, A., Matić, S., Rauš, Đ., Seletković, Z., 1995: Šumski sjemenski rajoni u Hrvatskoj (rukopis). Hrvatske šume p.o., Zagreb, Hrvatska, 1-111.

121) Gramaje, D., Mostert, L., Armengol, J., 2011: Characterization of *Cadophora luteo-olivacea* and *C. melinii* isolates obtained from grapevines and environmental samples from grapevine nurseries in Spain. Phytopathologia Mediterranea 50: 112-126.

122) Green, H., Larsen, J., Olsson, P. A., Jensen, D. F., Jakobsen, I., 1999: Suppression of the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum* by Mycelium of the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus intraradices* in Root-Free Soil. Applied and Environmental Microbiology 65 (4): 1428-1434.

123) Greenfield, M., Pareja, R., Ortiz, V., Gómez-Jiménez, M. I., Vega, F. E., Parsa, S., 2015: A novel method to scale up fungal endophyte isolations. Biocontrol Science and Technology 25 (10): 1208-1212.

124) Griffith, G. S., Boddy, L., 1988: Fungal communities in attached ash (*Fraxinus excelsior*) twigs. Transactions of the British Mycological Society 91 (4): 599-606.

125) Griffith, G. S., Boddy, L., 1990: Fungal decomposition of attached angiosperm twigs: Decay community development in ash, beech and oak. New Phytologist 116 (3): 407-415.

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

127) Grünwald, N. J., Martin, F. N., Larsen, M. M., Sullivan, C. M., Press, C. M., Coffey, M. D., Hansen, E. M., Parke, J. L., 2011: *Phytophthora*-ID.org: A sequence-based *Phytophthora* identification tool. Plant Disease 95 (3): 337-342.

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

129) Halmschlager, E., Butin, H., Donaubauer, E., 1993: Endophytische Pilze in Blättern und Zweigen von *Quercus petraea*. Forest Pathology 23 (1): 51-63.

130) Hammer, Ø., Harper, D. A. T., Ryan, P. D., 2001: PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontologia Electronica 4 (1): 1-9.

131) Haňáčková, Z., Havrdová, L., Černý, L., Zahradník, D., Koukol, O., 2017: Fungal Endophytes in Ash Shoots – Diversity and Inhibition of *Hymenoscyphus fraxineus*. Baltic Forestry 23 (1): 89-106.

132) Hansen, E. M., 2015: *Phytophthora* Species Emerging as Pathogens of Forest Trees. Current Forestry Reports 1 (1): 16-24.

133) Harapin, M., 1991: Značaj biotičkih faktora u procesu sušenja šuma. Šumarski List 115 (3-5): 193-202.

134) Harapin, M., Androić, M., 1996: Sušenje i zaštita šuma hrasta lužnjaka. Hrast lužnjak (*Quercus robur* L.) u Hrvatskoj, Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti i Hrvatske šume d.o.o., Zagreb, Hrvatska, 227-256.

135) Harman, G. E., Granett, A. L., 1972: Deterioration of stored pea seed: changes in germination, membrane permeability and ultrastructure resulting from infection by *Aspergillus ruber* and from aging. Physiological Plant Pathology 2 (3): 271-276.

136) Harman, G. E., Chet, I., Baker, R., 1981: Factors affecting *Trichoderma hamatum* applied to seeds as a biocontrol agent. Phytopathology (71): 669-572.

137) Harman, G. E., 2000: Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzinum* T-22. Plant disease 84 (4): 377-393.

138) Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M., 2004: *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiology 2 (1): 43-56.

139) Hauptman, T., Ogris, N., Jurc, D., 2012: Ash dieback in Slovenia. Forstschutz Aktuell 55: 62-63.

140) Hauptman, T., Ogris, N., de Groot, M., Piškur, B., Jurc, D., 2016: Individual resistance of *Fraxinus angustifolia* clones to ash dieback. Forest Pathology 46 (4): 269-280.

141) Hawksworth, D. L., 1991: The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. Mycological Research 95: 641-655.

142) Hawksworth, D. L., Kirk, P. M., Sutton, B. C., Pegler, D. N., 1995: Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. CAB International, Wallingford, UK, 1-616.

143) Hawksworth, D. L., 2001: The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. Mycological Research 105 (12): 1422-1432.

144) Hegol, M., 2016: Izolacija vrsta roda *Phytophthora* iz tla indirektnom metodom. Diplomski rad, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 1-37.

145) Hendry, S. J., Boddy, L., Lonsdale, D., 2002: Abiotic variables effect differential expression of latent infections in beech (*Fagus sylvatica*). New Phytologist 155 (3): 449-460.

146) Herrero Asensio, N., Sánchez Márquez, S., Zabalgogeazcoa, I., 2013: Mycovirus effect on the endophytic establishment of the entomopathogenic fungus *Tolypocladium cylindrosporum* in tomato and bean plants. BioControl 58 (2): 225-232.

147) Hibbett, D., Glotzer, D., 2011: Where are all the undocumented fungal species? A study of *Mortierella* demonstrates the need for sequence-based classification. New Phytologist 191 (3): 592-596.

148) Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P. M., Lucking, R., Thorsten Lumbsch, H., Lutzoni, F.,

Matheny, P. B., McLaughlin, D. J., Powell, M. J., Redhead, S., Schoch, C. L., Spatafora, J. W., Stalpers, J. A., Vilgalys, R., Aime, M. C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G. L., Castlebury, L. A., Crous, P. W., Dai, Y. C., Gams, W., Geiser, D. M., Griffith, G. W., Gueidan, C., Hawksworth, D. L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R. A., Hyde, K. D., Ironside, J. E., Koljalg, U., Kurtzman, C. P., Larsson, K. H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miadlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J. M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J. D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J. P., Schussler, A., Sugiyama, J., Thorn, R. G., Tibell, L., Untereiner, W. A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M. M., Winka, K., Yao, Y. J., Zhang, N., 2007: A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. Mycological Research 111 (5): 509-547.

149) Hoff, J. A., Klopfenstein, N. B., McDonald, G. I., Tonn, J. R., Kim, M. S., Zambino, P. J., Hessburg, P. F., Rogers, J. D., Peever, T. L., Carris, L. M., 2004: Fungal endophytes in woody roots of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and ponderosa pine (*Pinus ponderosa*). Forest Pathology 34 (4): 255-271.

150) Hsuan, H. M., Salleh, B., Zakaria, L., 2011: Molecular Identification of *Fusarium* Species in *Gibberella fujikuroi* Species Complex from Rice, Sugarcane and Maize from Peninsular Malaysia. International Journal of Molecular Sciences 12 (10): 6722.

151) Husson, C., Caël, O., Grandjean, J. P., Nageleisen, L. M., Marçais, B., 2012: Occurrence of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* on infected ash logs. Plant Pathology 61 (5): 889-895.

152) Ilić, J., Ćosić, J., Jurković, D., Vrandečić, K., 2012: Patogenost *Fusarium* spp. izoliranih s korova i biljnih ostataka u istočnoj Hrvatskoj za pšenicu i kukuruz. Poljoprivreda, 18 (2): 7-11.

153) Ivanová, H., Hrehová, Ľ., Pristaš, P., 2016: First Confirmed Report on *Fusarium sporotrichioides* on *Pinus ponderosa* var. *jeffreyi* in Slovakia. Plant Protection Science 52: 1-4.

154) Ivić, D., Cvjetković, B., Miličević, T., 2006: Dinamika i intenzitet razvoja bolesti na jabuci tijekom skladištenja. Poljoprivreda, 12 (2): 36-41.

155) Jankovsky, L., Holdenrieder, O., 2009: *Chalara fraxinea*-ash dieback in the Czech Republic. Plant Protection Science 45 (2): 74-78.

156) Jankowiak, R., Stepniewska, H., Bilanski, P., Kolarik, M., 2014: Occurrence of *Phytophthora plurivora* and other *Phytophthora* species in oak forests of southern Poland and their association with site conditions and the health status of trees. Folia Microbiologica (Praha) 59 (6): 531-42.

157) Jankowiak, R., Stępniewska, H., Bilański, P., 2015: Notes on some *Phytopythium* and *Pythium* species occurring in oak forests in southern Poland. Acta Mycologica 50 (1): 1052-1052.

158) Jeffers, S. N., Aldwinckle, H. S., 1987: Enhancing Detection of *Phytophthora cactorum* in Naturally Infested Soil. Phytopathology 77: 1475-1482.

159) Jeffers, S. N., 2007: Identifying species of *Phytophthora*. Clemson University South Carolina, Clemson, USA, 1-9.

160) Jönsson, U., Lundberg, L., Sonesson, K., Jung, T., 2003: First records of soilborne *Phytopthora* species in Swedish oak forests. Forest Pathology 33: 175-179.

161) Ju, Y. M., Rogers, J. D., 1996: A revision of the genus *Hypoxylon*. Mycologia memoir no. 20. APS Press, St. Paul, USA, 1-365.

162) Ju, Y. M., Hsieh, H. M., Vasilyeva, L., Akulov, A., 2009: Three new *Xylaria* species from Russian Far East. Mycologia 101 (4): 548-53.

163) Jumpponen, A., 2001: Dark septate endophytes – are they mycorrhizal? Mycorrhiza 11: 207-211.

164) Jung, T., Blaschke, H., Neumann, P., 1996: Isolation, identification and pathogenicity of *Phytophthora* species from declining oak stands. European Journal of Forest Pathology 26 (5): 253-272.

165) Jung, T., Blaschke, H., Oßwald, W., 2000: Involvement of soilborne *Phytophthora* species in Central European oak decline and the effect of site factors on the disease. Plant Pathology 49 (6): 706-718.

166) Jung, T., Blaschke, M., 2004: *Phytophthora* root and collar rot of alders in Bavaria: distribution, modes of spread and possible management strategies. Plant Pathology 53 (2): 197-208.

167) Jung, T., Nechwatal, J., 2008: *Phytophthora gallica* sp. nov., a new species from rhizosphere soil of declining oak and reed stands in France and Germany. Mycological Research 112 (10): 1195-1205.

168) Jung, T., Vettraino, A. M., Cech, T., Vannini, A., 2013: The Impact of Invasive *Phytophthora* Species on European Forests. *Phytophthora*: a global perspective, CAB International, Oxfordshire, UK, 146-158.

169) Kaliterna, J. Miličević, T., Cvjetković, B., 2012: Grapevine Trunk Diseases Associated with Fungi from the Diaporthaceae Family in Croatian Vineyards. Arhiv za higijenu rada i toksikologiju 63 (4): 471-478.

170) Kehr, R. D., Wulf, A., 1993: Fungi associated with above-ground portions of declining oaks (*Quercus robur*) in Germany. Forest Pathology 23 (1): 18-27.

171) Kirisits, T., Matlakova, M., Mottinger-Kroupa, S., Halmschlager, E., Lakatos, F., 2010: *Chalara fraxinea* associated with dieback of narrow-leafed ash (*Fraxinus angustifolia*). Plant Pathology 59 (2): 411-411.

172) Kirk, P. M., Cannon, P. F., Stalpers, J. A., 2008: Dictionary of the fungi. CABI, Wallingford, UK, 1-771.

173) Kosalec, I., Pepeljnjak, S., 2004: Kemizam i biološki učinci gliotoksina. Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, 55 (4): 313-320.

174) Kovačević, Ž., 1928: Sušenje hrastova u Posavini sa entomološko-biološkog gledišta. Šumarski List (4): 182-185.

175) Kowalski, T., Kehr, R. D., 1992: Endophytic fungal colonization of branch bases in several forest tree species. Sydowia 44 (2): 137-168.

176) Kowalski, T., Halmschlager, E., Schrader, K., 1998: *Cryptosporiopsis melanigena* sp. nov., a root-inhabiting fungus of *Quercus robur* and *Q. petraea*. Mycological Research 102 (3): 347-354.

177) Kowalski, T., Łukomska, A., 2005: The studies on ash dying (*Fraxinus excelsior* L.) in the Włoszczowa Forest Unit stands. Acta Agrobotanica 58 (2): 429-440.

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

179) Kowalski, T., Holdenrieder, O., 2009: The teleomorph of *Chalara fraxinea*, the causal agent of ash dieback. Forest Pathology 39 (5): 304-308.

180) Kowalski, T., Czekaj, A., 2010: Disease symptoms and fungi on dying ash trees (*Fraxinus excelsior* L.) in Staszów Forest District stands. Forest Research Papers 71 (4): 357-368.

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

182) Kowalski, T., Bilański, P., Kraj, W., 2017: Pathogenicity of fungi associated with ash dieback towards *Fraxinus excelsior*. Plant Pathology: 1-11.

183) Kozarac, J., 1897: Šumogojstveni i drvotržni aforizmi, crpljeni na temelju prodaje posavskih hrastovih šuma u zadnjem desetgodištu. Šumarski List 21 (7): 297-344.

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

185) Kräutler, K., Kirisits, T., 2012: The ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus* is asociated with leaf symptoms on ash species (*Fraxinus* spp.). Journal of Agricultural Extension and Rural Development 9 (4): 261-265.

186) Kubisch, P., Hertel, D., Leuschner, C., 2015: Do ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal temperate tree species systematically differ in root order-related fine root morphology and biomass? Frontiers in Plant Science 6: 1-12.

187) Kubisch, P., Hertel, D., Leuschner, C., 2016: Fine Root Productivity and Turnover of Ectomycorrhizal and Arbuscular Mycorrhizal Tree Species in a Temperate Broad-Leaved Mixed Forest. Frontiers in Plant Science 7: 1233.

188) Kuldau, G. A., Yates, I. E., 2000: Evidence for *Fusarium* endophytes in cultivated and wild plants. Microbial Endophytes, Marcel Dekker, New York, USA, 85-120.

189) Lakatos, F., Mirtchev, S., Mehmeti, A., Shabanaj, H., 2014: Manual for visual assessment of forest crown condition. FAO, Pristina, Kosovo, 1-17.

190) Lamar, R. T., Davey, C. B., 1988: Comparative effectivity of three *Fraxinus pennsylvanica* Marsh vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in a high-phosphorus nursery soil. New Phytologist 109 (2): 171-181.

191) Lang, C., Seven, J., Polle, A., 2011: Host preferences and differential contributions of deciduous tree species shape mycorrhizal species richness in a mixed Central European forest. Mycorrhiza 21 (4): 297-308.

192) Lendarić, Josip, 2016: Molekularna identifikacija gljiva izoliranih iz bolesnog drva vinove loze u Hrvatskoj. Diplomski rad, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 1-54.

193) LéVesque, C. A., de Cock, A. W., 2004: Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. Mycological Research 108 (12): 1363-1383.

194) Lévesque, C. A., Brouwer, H., Cano, L., Hamilton, J. P., Holt, C., Huitema, E., Raffaele, S., Robideau, G. P., Thines, M., Win, J., 2010: Genome sequence of the necrotrophic plant pathogen *Pythium ultimum* reveals original pathogenicity mechanisms and effector repertoire. Genome biology 11 (7): 1-22.

195) Lewis, D. H., 1985: Symbiosis and mutualism: Crisp concepts and soggy semantics. The biology of mutualism, Croom-Helm Ltd., London, UK, 29-39.

196) Li Destri Nicosia, M. G., Mosca, S., Mercurio, R., Schena, L., 2014: Dieback of *Pinus nigra* Seedlings Caused by a Strain of *Trichoderma viride*. Plant Disease 99 (1): 44-49.

197) Liers, C., Arnstadt, T., Ullrich, R., Hofrichter, M., 2011: Patterns of lignin degradation and oxidative enzyme secretion by different wood- and litter-colonizing basidiomycetes and ascomycetes grown on beech-wood. FEMS Microbiology Ecology 78 (1): 91-102.

198) Lu, X. H., Jiao, X. L., Chen, A. J., Luo, Y., Gao, W. W., 2014: First Report of *Ilyonectria robusta* Causing Rusty Root of Asian Ginseng in China. Plant Disease 99 (1): 156-156.

199) Lu, Y., Chen, C., Chen, H., Zhang, J., Chen, W., 2012: Isolation and Identification of Endophytic Fungi from *Actinidia macrosperma* and Investigation of Their Bioactivities. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: 1-8.

200) Luchi, N., Capretti, P., Feducci, M., Vannini, A., Ceccarelli, B., Vettraino, A., 2016: Latent infection of *Biscogniauxia nummularia* in *Fagus sylvatica*: a possible bioindicator of beech health conditions. iForest - Biogeosciences and Forestry 9 (1): 49-54.

201) Lygis, V., Vasiliauskas, R., Larsson, K. H., Stenlid, J., 2005: Wood-inhabiting fungi in stems of *Fraxinus excelsior* in declining ash stands of northern Lithuania, with particular reference to *Armillaria cepistipes*. Scandinavian Journal of Forest Research 20: 337-346.

202) Manion, P. D., 1981: Tree disease concepts. Prentice-Hall Inc., New Jersey, USA, 1-399.

203) Marano, A. V., Jesus, A. L., de Souza, J. I., Jerônimo, G. H., Gonçalves, D. R., Boro, M. C., Rocha, S. C. O., Pires-Zottarelli, C. L. A., 2016: Ecological roles of saprotrophic *Peronosporales* (*Oomycetes, Straminipila*) in natural environments. Fungal Ecology 19: 77-88.

204) Marano, A. V., Gleason, F., H., Rocha, S. C. O., Pires-Zottarelli, C. L. A., de Souza, J. I., 2017: Crown *Oomycetes* have evolved as effective plant and animal parasites. The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem, CRC Press, Boca Raton, USA, 257-274.

205) Marçais, B., Caël, O., Delatour, C., 2011: Interaction between root rot basidiomycetes and *Phytophthora* species on pedunculate oak. Plant Pathology 60 (2): 296-303.

206) Marçais, B., Husson, C., Godart, L., Caël, O., 2016: Influence of site and stand factors on *Hymenoscyphus fraxineus*-induced basal lesions. Plant Pathology 65 (9): 1452-1461.

207) Martín-García, J., Espiga, E., Pando, V., Diez, J. J., 2011: Factors influencing endophytic communities in poplar plantations. Silva Fennica 45 (2): 169-180.

208) Marçais, B., Bréda, N., 2006: Role of an opportunistic pathogen in the decline of stressed oak trees. Journal of Ecology 94 (6): 1214-1223.

209) Matić, S., Skenderović, J., 1993: Studija biološkog rješenja šume Turopoljski lug ugrožene propadanjem (uzgojna istraživanja). Glasnik za šumske pokuse 29: 295-334.

210) Matsiakh, I., Oszako, T., Kramarets, V., Nowakowska, J. A., 2016: *Phytophthora* and *Pythium* Species Detected in Rivers of the Polish-Ukrainian Border Areas. Baltic Forestry 22 (2): 230-238.

211) Mayer, Ž., Hećimović, Ž., 2008: Obnova ritskih šuma Hrvatskog Podunavlja uz oplemenjivanje sadnicama poljskog jasena (*Fraxinus angustifolia* Vahl). Šumarski List 132 (1-2): 43-52.

212) Medina, M., Collins, A. G., Taylor, J. W., Valentine, J. W., Lipps, J. H., Amaral-Zettler, L., Sogin, M. L., 2003: Phylogeny of *Opisthokonta* and the evolution of multicellularity and complexity in *Fungi* and *Metazoa*. International Journal of Astrobiology 2 (3): 203-211.

213) Melo, R. F. R., Miller, A. N., Maia, L. C., 2015: The genus *Podospora* (*Lasiosphaeriaceae, Sordariales*) in Brazil. Mycosphere 6 (2): 201-215.

214) Meng, S., Torto-Alalibo, T., Chibucos, M. C., Tyler, B. M., Dean, R. A., 2009: Common processes in pathogenesis by fungal and oomycete plant pathogens, described with Gene Ontology terms. BMC Microbiology 9 (1): 1-11.

215) Menkis, A., Vasiliauskas, R., Taylor, A. F. S., Stenström, E., Stenlid, J., Finlay, R., 2006: Fungi in decayed roots of conifer seedlings in forest nurseries, afforested clear-cuts and abandoned farmland. Plant Pathology 55 (1): 117-129.

216) Micallef, L., Rodgers, P., 2014: eulerAPE: Drawing Area-Proportional 3-Venn Diagrams Using Ellipses. PLOS ONE 9 (7): 1-18.

217) Miller, J. D., Mackenzie, S., Foto, M., Adams, G. W., Findlay, J. A., 2002: Needles of white spruce inoculated with rugulosin-producing endophytes contain rugulosin reducing spruce budworm growth rate. Mycological Research 106 (4): 471-479.

218) Milotić, M., Barić, L., Diminić, D., 2012: The role of fungi in holm oak (*Quercus ilex* L.) crown dieback in Croatia. IUFRO Conference: Forests for cities, forests for people-Perspectives on urban forest governance, Zagreb, Hrvatska,

219) Milotić, M., Kranjec, J., Diminić, D., 2016: Current status of ash dieback disease *Hymenoscyphus fraxineus* in Croatia. Natural resources, green technology & sustainable development - GREEN/2, Zagreb, Hrvatska, 124-124.

220) Moricca, S., Ginetti, B., Ragazzi, A., 2012: Species- and organ-specificity in endophytes colonizing healthy and declining Mediterranean oaks. Phytopathologia Mediterranea 51 (3): 587-598.

221) Mrázková, M., Černý, K., Tomšovský, M., Strnadová, V., Gregorová, B., Holub, V., Pánek, M., Havrdová, L., Hejná, M., 2013: Occurrence of *Phytophthora multivora* and *Phytophthora plurivora* in the Czech Republic. Plant Protection Science 49 (4): 155-164.

222) Mueller-Dombois, D., 1986: Perspectives for an etiology of stand-level dieback. Annual Review of Ecology Evolution and Systematics 17: 221-243.

223) Nenadić, Đ., 1940: O posljedicama sušenja hrastovih šuma Gradiške imovne općine. Glasnik za šumske pokuse (7): 1-29.

224) Nicoletti, R., Fiorentino, A., Scognamiglio, M., 2014: Endophytism of *Penicillium* Species in Woody Plants. The Open Mycology Journal 8: 1-26.

225) Noordeloos, M. E., Kuyper, T. W., Vellinga, E. C., 1999: Flora Agaricina Neerlandica. A. A. Balkema, Rotterdam, Netherlands, 1-200.

226) O'Brien, H. E., Parrent, J. L., Jackson, J. A., Moncalvo, J. M., Vilgalys, R., 2005: Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. Applied and Environmental Microbiology 71 (9): 5544-5550.

227) Oliveros, J. C., 2007: VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams.

228) Olson, Å., Aerts, A., Asiegbu, F., Belbahri, L., Bouzid, O., Broberg, A., Canbäck, B., Coutinho, P. M., Cullen, D., Dalman, K., Deflorio, G., van Diepen, L. T. A., Dunand, C., Duplessis, S., Durling, M., Gonthier, P., Grimwood, J., Fossdal, C. G., Hansson, D., Henrissat, B., Hietala, A., Himmelstrand, K., Hoffmeister, D., Högberg, N., James, T. Y., Karlsson, M., Kohler, A., Kües, U., Lee, Y.-H., Lin, Y.-C., Lind, M., Lindquist, E., Lombard, V., Lucas, S., Lundén, K., Morin, E., Murat, C., Park, J., Raffaello, T., Rouzé, P., Salamov, A., Schmutz, J., Solheim, H., Ståhlberg, J., Vélëz, H., de Vries, R. P., Wiebenga, A., Woodward, S., Yakovlev, I., Garbelotto, M., Martin, F., Grigoriev, I. V., Stenlid, J., 2012: Insight into trade-off between wood decay and parasitism from the genome of a fungal forest pathogen. New Phytologist 194 (4): 1001-1013.

229) Orlikowski, L. B., Ptaszek, M., Rodziewicz, A., Nechwatal, J., Thinggaard, K., Jung, T., 2011: *Phytophthora* root and collar rot of mature *Fraxinus excelsior* in forest stands in Poland and Denmark. Forest Pathology 41 (6): 510-519.

230) Oßwald, W., Jung, T., Nechwatal, J., Schlenzig, A., Fleischmann, F., 2001: Significance of *Phytophthora* and *Pythium* for oak, alder and spruce decline. Journal of Forest Science 47: 96-103.

231) Pacioni, G., Leonardi, M., Aimola, P., Ragnelli, A. M., Rubini, A., Paolocci, F., 2007: Isolation and characterization of some mycelia inhabiting *Tuber ascomata*. Mycological Research 111 (12): 1450-1460.

232) Packer, A., Clay, K., 2000: Soil pathogens and spatial patterns of seedling mortality in a temperate tree. Nature 404: 278-281.

233) Patterson, D. J., Sogin, M. L., 1992: Eukaryote Origins and Protistan Diversity. The Origin and Evolution of Prokaryotic and Eukaryotic Cells, World Scientific, Singapore, 13-46.

234) Pernek, M., 2007: Utjecaj entomopatogene gljive *Beauveria bassiana* na mortalitet jelovih potkornjaka *Pityokteines spinidens* i *Pityokteines curvidens*. Radovi, 42 (2): 143-153.

235) Pernek, M., Županić, M., Diminić, D., Cech, T., 2011: Vrste roda *Phytophthora* na bukvi i topolama u Hrvatskoj. Šumarski List 13: 130-137.

236) Peter, M., Ayer, F., Cudlín, P., Egli, S., 2008: Belowground ectomycorrhizal communities in three Norway spruce stands with different degrees of decline in the Czech Republic. Mycorrhiza 18 (3): 157-169.

237) Petrač, I., 2016: Usporedba različitih metoda izolacije gljiva i njima sličnih organizama iz tla. Diplomski rad, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 1-31.

238) Petrini, O., 1986: Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. Microbiology of the phyllosphere, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 175-187.

239) Pirttilä, A. M., Frank, A. C., 2011: Endophytes of Forest Trees: Biology and Applications. Springer Science & Business Media, Berlin, Germany, 1-322.

240) Porras-Alfaro, A., Bayman, P., 2011: Hidden Fungi, Emergent Properties: Endophytes and Microbiomes. Annual Review of Phytopathology 49: 291-315.

241) Potočić, N., Seletković, I., Jakovljević, T., Marjanović, H., Indir, K., Medak, J., Lacković, N., 2016: Oštećenost šumskih ekosustava Republike Hrvatske: izvješće za 2015. godinu. Hrvatski šumarski institut, Jastrebarsko, Hrvatska, 1-124.

242) Potočić, N., Seletković, I., Jakovljević, T., Marjanović, H., Indir, K., Medak, J., Lacković, N., Ognjenović, M., Laslo, A., 2017: Oštećenost šumskih ekosustava Republike Hrvatske – izvješće za 2016. godinu. Nacionalni koordinacijski centar za procjenu i motrenje utjecaja atmosferskog onečišćenja i drugih čimbenika na šumske ekosustave, Hrvatski šumarski institut, Jastrebarsko, Hrvatska.

243) Pouska, V., Macek, P., Zíbarová, L., 2016: The relation of fungal communities to wood microclimate in a mountain spruce forest. Fungal Ecology 21: 1-9.

244) Prpić, B., Komlenović, N., Seletković, Z., 1988: Propadanje šuma u SR Hrvatskoj. Šumarski List 122 (5-6): 9-29.

245) Prpić, B., Seletković, Z., Ivkov, M., 1991: Propadanje šuma u Hrvatskoj i odnos pojave prema biotskim i abiotskim činiteljima danas i u prošlosti. Šumarski List 115 (3-5): 107-129.

246) Prpić, B., 1992: Odabiranje oštećenih stabala za sječu i obnova sastojina opustošenih propadanjem. Šumarski List (1992): 515-522.

247) Prpić, B., Matić, S., Jurjević, P., Jakovac, H., Milković, I., 2005: Općekorisno i gospodarsko značenje poplavnih šuma. Poplavne šume u Hrvatskoj, Akademija šumarskih znanosti, Zagreb, Hrvatska, 50-67.

248) Przybył, K., 2002a: Fungi associated with necrotic apical parts of *Fraxinus excelsior* shoots. Forest Pathology 32 (6): 387-394.

249) Przybył, K., 2002b: Mycobiota of thin roots showing decay of *Fraxinus excelsior* L. young trees. Dendrobiology 48: 65-69.

250) Pukacki, P. M., Przybył, K., 2005: Frost Injury as a Possible Inciting Factor in Bud and Shoot Necroses of *Fraxinus excelsior* L. Journal of Phytopathology 153 (9): 512-516.

251) Ragazzi, A., Mancini, F., Dellavalle, I., Capretti, P., Moricca, S., 2001: Endophytic fungi in *Quercus cerris*: isolation frequency in relation to phenological phase, tree health and the organ affected. Phytopathologia Mediterranea 40: 165-171.

252) Ragazzi, A., Moricca, S., Capretti, P., Dellavalle, I., Turco, E., 2003: Differences in composition of endophytic mycobiota in twigs and leaves of healthy and declining *Quercus* species in Italy. Forest Pathology 33 (1): 31-38.

253) Ramanpreet, K. S., 2012: The analysis of *Metarhizium robertsii* potential as endophytic plant root coloniser, plant growth enhancer and antagonist to bean root pathogen *Fusarium solani* f. sp. *phaseolis*. Brock University, Ontario, USA, 1-84.

254) Rauš, Đ., 1987: Šumarska fitocenologija. Sveučilišna naklada Liber, Zagreb, Hrvatska.

255) Redman, R. S., Dunigan, D. D., Rodriguez, R. J., 2001: Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader? New Phytologist 151 (3): 705-716.

256) Reinhart, C. O., Packer, A., Van der Putten, W. H., Clay, K., 2003: Plant-soil biota interactions and spatial distribution of black cherry in its native invasive ranges. Ecology Letters 6: 1046-1050.

257) Rice, A. V., Currah, R. S., 2006: Two new species of *Pseudogymnoascus* with *Geomyces* anamorphs and their phylogenetic relationship with *Gymnostellatospora*. Mycologia 98 (2): 307-18.

258) Richard, F., Millot, S., Gardes, M., Selosse, M. A., 2005: Diversity and specificity of ectomycorrhizal fungi retrieved from an old-growth Mediterranean forest dominated by *Quercus ilex*. New Phytologist 166 (3): 1011-1023.

259) Richards, T. A., Dacks, J. B., Jenkinson, J. M., Thornton, C. R., Talbot, N. J., 2006: Evolution of filamentous plant pathogens: gene exchange across eukaryotic kingdoms. Current Biology 16 (18): 1857-1864.

260) Riffle, J. W., 1973: Pure Culture Synthesis of Ectomycorrhizae on *Pinus ponderosa* with Species of *Amanita*, *Suillus*, and *Lactarius*. Forest Science 19 (4): 242-250.

261) Rishbeth, J., 1978: Effects of soil temperature and atmosphere on growth of Armillaria rhizomorphs. Transactions of the British Mycological Society 70 (2): 213-220.

262) Romanazzi, G., Mancini, V., Murolo, S., 2012: First report of *Leucostoma cinctum* on sweet cherry and European plum in Italy. Phytopathologia Mediterranea 51 (2): 365-368.

263) Rossman, A. Y., Palm, M. E., 2006: Why are *Phytophthora* and other *Oomycota* not true Fungi? Outlooks on Pest Management 17 (5): 217-219.

264) Saikkonen, K., Wäli, P., Helander, M., Faeth, S. H., 2004: Evolution of endophyte–plant symbioses. Trends in Plant Science 9 (6): 275-280.

265) Saldajeno, M. G. B., Chandanie, W. A., Kubota, M., Hyakumachi, M., 2008: Effects of Interactions of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Beneficial Saprophytic Mycoflora on Plant Growth and Disease Protection. Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry, Springer, Dordrecht, Netherlands, 211-226.

266) Sambrook, J., Russel, D. W., 2001: Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 1-2344.

267) Sánchez Márquez, S., Bills, G. F., Zabalgogeazcoa, I., 2007: The endophytic mycobiota of the grass *Dactylis glomerata*. Fungal Diversity 27: 171-195.

268) Santamaría, J., Bayman, P., 2005: Fungal Epiphytes and Endophytes of Coffee Leaves (*Coffea arabica*). Microbial Ecology 50 (1): 1-8.

269) Santamaría, O., Diez, J. J., 2005: Fungi in leaves, twigs and stem bark of *Populus tremula* from northern Spain. Forest Pathology 35 (2): 95-104.

270) Schmit, J. P., Mueller, G. M., 2007: An estimate of the lower limit of global fungal diversity. Biodiversity and Conservation 16 (1): 99-111.

271) Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Consortium, F. B., 2012: Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. Proceedings of the National Academy of Sciences 109 (16): 6241-6246.

272) Schroers, H.-J., Samuels, G. J., Seifert, K. A., Gams, W., 1999: Classification of the Mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its Relationship to *Bionectria ochroleuca*, and Notes on Other *Gliocladium*-like Fungi. Mycologia 91 (2): 365-385.

273) Schulz, B., Boyle, C., 2005: The endophytic continuum. Mycological Research 109 (6): 661-686.

274) Schulze, E.-D., Lange, O. L., Oren, R., Asche, R., 2012: Forest decline and air pollution: a study of spruce (*Picea abies*) on acid soils. Springer Science & Business Media, Berlin, Germany, 1-469.

275) Schumacher, J., Wulf, A., Leonhard, S., 2007: First record of *Chalara fraxinea* T. Kowalski sp. nov. in Germany-a new agent of ash decline. Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes 59 (6): 121-123.

276) Schumacher, J., Kehr, R., Leonhard, S., 2010: Mycological and histological investigations of *Fraxinus excelsior* nursery saplings naturally infected by *Chalara fraxinea*. Forest Pathology 40 (5): 419-429.

277) Schuster, A., Schmoll, M., 2010: Biology and biotechnology of *Trichoderma*. Applied Microbiology and Biotechnology 87 (3): 787-799.

278) Schwarze, F. W. M. R., Ferner, D., 2003: *Ganoderma* on trees-differentiation of species and studies of invasiveness. Arboricultural Journal 27 (1): 59-77.

279) Seifert, K. A., 2009: Progress towards DNA barcoding of fungi. Molecular Ecology Resources 9 (1): 83-89.

280) Selosse, M.-A., Baudoin, E., Vandenkoornhuyse, P., 2004: Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. Comptes Rendus Biologies 327 (7): 639-648.

281) Shannon, C. E., 1948: A mathematical theory of communication. The Bell System Technical Journal 27: 379-423.

282) Sherwood, M., Carroll, G., 1974: Fungal Succession on Needles and Young Twigs of Old-Growth Douglas Fir. Mycologia 66 (3): 499-506.

283) Sieber, T., Sieber-Canavesi, F., Dorworth, C., 1991: Endophytic fungi of red alder (*Alnus rubra*) leaves and twigs in British Columbia. Canadian Journal of Botany 69 (2): 407-411.

284) Sieber, T. N., 2007: Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? Fungal Biology Reviews 21 (2–3): 75-89.

285) Silvie, S., xe, Miroslav, V., xe, tka, Jan, P., xfd, 1996: Root Symbioses of Alnus glutinosa (L.) Gaertn. and Their Possible Role in Alder Decline: A Preliminary Study. Folia Geobotanica & Phytotaxonomica 31 (1): 153-162.

286) Sinclair, J. B., Cerkauskas, R. F., 1996: Latent infection vs. endophytic colonization by fungi. Endophytic fungi in grasses and woody plants, American Phytopathological Society Press, St. Paul, USA, 3-30.

287) Singh, P., 1983: *Armillaria* root rot: influence of soil nutrients and pH on the susceptibility of conifer species to the disease. Forest Pathology 13 (2): 92-101.

288) Skovsgaard, J. P., Thomsen, I. M., Skovgaard, I. M., Martinussen, T., 2010: Associations among symptoms of dieback in even-aged stands of ash (*Fraxinus excelsior* L.). Forest Pathology 40 (1): 7-18.

289) Slippers, B., Wingfield, M. J., 2007: *Botryosphaeriaceae* as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. Fungal Biology Reviews 21 (2–3): 90-106.

290) Smith, S. E., Read, D. J., 1997: Mycorrhizal symbiosis. Academy Press, London, UK, 1-800.

291) Sokolov, D. V., 1964: Root rot caused by *Armillaria mellea* and its control. Izadatel'stvo Lesnaya Promýshlennost', Moscow, Russia, 1-235.

292) Sørensen, T., 1948: A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species and its application to analyses of the vegetation on Danish commons. Kongelige Danske Videnskabernes Selskab 5 (4): 1-34.

293) Spaić, I., 1955: Problematika zaštite šuma u NR Hrvatskoj. Šumarski List 79 (11-12): 84-112.

294) Spaić, I., 1986: Uzroci propadanja i sušenja poljskog jasena na teritoriju SFRJ. Znanstveni skup o Josipu Kozarcu u povodu 80. godišnjice smrti, Vinkovci, Hrvatska,

295) Steiner, M., Linkov, I., Yoshida, S., 2002: The role of fungi in the transfer and cycling of radionuclides in forest ecosystems. Journal of Environmental Radioactivity 58 (2–3): 217-241.

296) Stone, J. K., Bacon, C. W., White Jr, J. F., 2000: An overview of endophytic microbes: endophytism defined. Microbial Endophytes, Marcel Dekker, New York, USA, 29-33.

297) Stone, J. K., Polishook, J. D., White, J. F., 2004: Endophytic fungi. Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods, Elsevier Academic Press, London, UK, 241-270.

298) Streito, J. C., Gibbs, J. N., 1999: Alder *Phytophthora* in France and the United Kingdom: symptoms, isolation methods, distribution and damage. First International Meeting on Phytophthoras in Forest and Wildland Ecosystems, Oregon, USA, 37-39.

299) Škorić, A., Racz, Z., Bogunović, M., 1989: Pedosfera i vodni režim Posavlja. Rijeka Sava - zaštita i korištenje voda, JAZU, Zagreb, Hrvatska, 69-99.

300) Talley, S. M., Coley, P. D., Kursar, T. A., 2002: The effects of weather on fungal abundance and richness among 25 communities in the Intermountain West. BMC Ecology 2 (1): 7.

301) Tejesvi, M. V., Kajula, M., Mattila, S., Pirttila, A. M., 2011: Bioactivity and genetic diversity of endophytic fungi in *Rhododendron tomentosum* Harmaja. Fungal Diversity 47: 97-107.

302) Temunović, M., Franjić, J., Šatovic, Z., Grgurev, M., Frascaria-Lacoste, N., Fernández-Manjarrés, J. F., 2012: Environmental Heterogeneity Explains the Genetic

Structure of Continental and Mediterranean Populations of *Fraxinus angustifolia* Vahl. PLOS ONE 7 (8): 1-13.

303) Themann, K., Werres, S., 1999: Baiting of *Phytophthora* spp. with the rhododendron leaf test. First International Meeting on Phytophthoras in Forest and Wildland Ecosystems, Oregon, USA, 141-144.

304) Thomidis, T., Michailides, T. J., 2009: Studies on *Diaporthe eres* as a new pathogen of peach trees in Greece. Plant Disease 93: 1293-1297.

305) Thomsen, I. M., Skovsgaard, J. P., 2007: Attacks by honey fungus associated with crown dieback of ash. Skoven 39: 518-520.

306) Tomić, Ž., Ivić, D., 2013: *Phytophthora alni* – prvi nalaz na johi (*Alnus glutinosa*) u Hrvatskoj. 57. Seminar biljne zaštite, Opatija, Hrvatska.

307) Tortić, M., 1970: *Ganoderma adspersum* (S. Schulz) Donk (= *Ganoderma europaeum* Steyaert) and its distribution in Yugoslavia. Acta Botanica Croatica 30: 113-118.

308) Tsuneo, W., 2002: Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species. CRC Press Inc., Boca Raton, USA, 1-506.

309) Udayanga, D., Castlebury, L. A., Rossman, A. Y., Chukeatirote, E., Hyde, K. D., 2014: Insights into the genus *Diaporthe*: phylogenetic species delimitation in the *D. eres* species complex. Fungal Diversity 67: 203-229.

310) Underwood, W., 2012: The plant cell wall: a dynamic barrier against pathogen invasion. Frontiers in plant science 3: 1-6.

311) Vajda, Z., 1948: Koji su uzroci sušenju hrastovih posavskih i donjo-podravskih šuma. Šumarski List 72 (4): 105-113.

312) Van der Putten, W. H., Peters, B. A. M., 1997: How soil-borne pathogens may affect plant competition. Ecology 78: 1785-1795.

313) Vasiliauskas, R., Bakys, R., Lygis, V., Ihrmark, K., Barklund, P., Stenlid, J., 2006: Fungi associated with the decline of *Fraxinus excelsior* in the Baltic States and Sweden. Possible limitation of decline phenomena in broadleaved stands, 45-53.

314) Vasiliauskas, R., Menkis, A., Finlay, R. D., Stenlid, J., 2007: Wood-decay fungi in fine living roots of conifer seedlings. New Phytologist 174 (2): 441-446.

315) Vega, F. E., Posada, F., Aime, C. M., Pava-Ripoll, M., Infante, F., Rehner, S. A., 2008: Entomopathogenic fungal endophytes. Biological Control 46: 72-82.

316) Verkley, G. J. M., Dukik, K., Renfurm, R., Göker, M., Stielow, J. B., 2014: Novel genera and species of coniothyrium-like fungi in *Montagnulaceae* (*Ascomycota*). Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi 32 (1): 25-51.

317) Vettraino, A. M., Natili, G., Anselmi, N., Vannini, A., 1999: Recent advances in studies on *Phytophthora* species associated with *Castanea sativa* and *Quercus cerris* in Italy. First International Meeting on Phytophthoras in Forest and Wildland Ecosystems, Oregon, USA, 34-36.

318) Vettraino, A. M., Barzanti, G. P., Bianco, M. C., Ragazzi, A., Capretti, P., Paoletti, E., Luisi, N., Anselmi, N., Vannini, A., 2002: Occurrence of *Phytophthora* species in oak stands in Italy and their association with declining oak trees. Forest Pathology 32 (1): 19-28.

319) Vinceković, M., Jalšenjak, N., Topolovec-Pintarić, S., Đermić, E., Bujan, M., Jurić, S., 2016: Encapsulation of Biological and Chemical Agents for Plant Nutrition and Protection: Chitosan/Alginate Microcapsules Loaded with Copper Cations and *Trichoderma viride*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 64: 8073-8083.

320) Voříšková, J., Brabcová, V., Cajthaml, T., Baldrian, P., 2014: Seasonal dynamics of fungal communities in a temperate oak forest soil. New Phytologist 201 (1): 269-278.

321) Vukelić, J., Tikvić, I., Seletković, Z., Baričević, D., 1997: Dieback of Pedunculate Oak from the Ecological-Vegetative Aspect. IUFRO conference meeting: Advances in Research in Intermediate Oak Stands, Freiburg, Germany, 213-222.

322) Vukelić, J., Rauš, Đ., 1998: Šumarska fitocenoloija i šumske zajednice u Hrvatskoj. Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska, 1-310.

323) Wagner, L., Stielow, B., Hoffmann, K., Petkovits, T., Papp, T., Vágvölgyi, C., de Hoog, G. S., Verkley, G., Voigt, K., 2013: A comprehensive molecular phylogeny of the *Mortierellales* (*Mortierellomycotina*) based on nuclear ribosomal DNA. Persoonia : Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi 30: 77-93.

324) Waksman, S. A., 1922: A method for counting the number of fungi in the soil. Journal of Bacteriology 7 (3): 339-341.

325) Warcup, J. H., 1950: The Soil-Plate Method for Isolation of Fungi from Soil. Nature 166: 117-118.

326) Wargo, P. M., 1977: *Armillaria mellea* and *Agrilus bilineatus* and mortality of defoliated oak trees. Forest Science 23: 485-492.

327) Weber, R. W., Sulzer, F.-L., Haarhaus, M., 2004: *Pythium undulatum*, cause of root rot of *Abies procera* Christmas trees and *Pseudotsuga menziesii* in northern Germany. Mycological Progress 3 (3): 179-188.

328) Webster, J., Weber, R. W. S., 2007: Introduction to fungi. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1-875.

329) Westover, K. M., Bever, J. D., 2001: Mechanisms of plant species coexistence: roles of rhizophere bacteria and root fungal pathogens. Ecology 82: 3285-3294.

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

331) Wilson, D., Faeth, S. H., 2001: Do Fungal Endophytes Result in Selection for Leafminer Ovipositional Preference? Ecology 82 (4): 1097-1111.

332) Yamada, A., Ogura, T., Ohmasa, M., 2001: Cultivation of mushrooms of edible ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus densiflora* by in vitro mycorrhizal synthesis. Mycorrhiza 11 (2): 59-66.

333) Yu, Q. Y., Fang, L., Yun, M. Q., Ji, G. W., Rong, S. H., Liang, B. L., 2016: Endophytic fungi harbored in the root of *Sophora tonkinensis* Gapnep: Diversity and biocontrol potential against phytopathogens. Microbiology 2017: 1-17.

334) Zgrablić, Ž., 2015: Mikorizne gljive kao biološki pokazatelj zdravstvenog stanja kultura crnog bora (*Pinus nigra* J. F. Arnold) u Istri. Doktorski rad, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska, 1-155.

335) Županić, M., 2004: *Phytophthora quercina*, nova gljivična bolest na hrastovima. 48. Seminar biljne zaštite, Opatija, Hrvatska.

Internet izvori:

336) https://bib.irb.hr/index.html

337) http://genome.jgi.doe.gov/Ilyrob1/Ilyrob1.home.html

338) http://hrcak.srce.hr/

339) http://sumlist.sumari.hr/goosl.asp

340) http://www.gelanalyzer.com/

341) http://www.indexfungorum.org/names/names.asp

PRILOZI

Prilog 1. Popis uzorkovanih stabala s podacima o zdravstvenom stanju, prisutnosti simptoma na korijenu i deblu, promjeru i točnoj lokaciji

Lokacija	Stablo (broj/oznaka)	Kategorija zdravstvenog stanja	Nekroze na korijenu	Nekroze na deblu	Promjer (cm)	Koordinate
Dugo Selo GJ Črnovščak 16g	1	3	DA	DA	14,8	45.757346, 16.303511
	2	3	DA	NE	13,7	45.757016, 16.303338
	3	1	NE	NE	25,1	45.756699, 16.303317
	4	3	DA	DA	17,4	45.757286, 16.302558
	5	1	NE	NE	14,5	45.757500, 16.303114
	6	3	DA	DA	10,7	45.757225, 16.302153
	7	2	NE	NE	12,8	45.757220, 16.302084
	8	1	NE	NE	11,7	45.757386, 16.302138
	9	2	DA	DA	16,4	45.757154, 16.302279
	10	3	DA	NE	19,3	45.757181, 16.302933
	11	3	DA	NE	18,1	45.757486, 16.302981
	12	1	NE	NE	18,2	45.757061, 16.302042
	13	3	DA	DA	13,1	45.757192, 16.302431
	14	2	DA	DA	12,6	45.757481, 16.302794
	15	2	DA	DA	11,9	45.757194, 16.302619
	16	1	NE	NE	18,5	45.757261, 16.302788
	17	1	NE	NE	30,2	45.757360, 16.302718
	18	1	NE	NE	12,9	45.757335, 16.302524
	19	1	NE	NE	12,5	45.757325, 16.302467
	20	2	DA	DA	26,0	45.757391, 16.302442
	21	1	NE	DA	11,0	45.757269, 16.303093
	22	3	DA	DA	13,3	45.757386, 16.303249
	23	3	DA	DA	15,4	45.757407, 16.303404
	24	3	DA	DA	13,3	45.757398, 16.303634
	25	2	DA	DA	22,9	45.757264, 16.304550
	26	2	DA	DA	19,8	45.757416, 16.304310
	27	2	DA	DA	13,9	45.757383, 16.304251
	28	1	NE	NE	20,5	45.757304, 16.304050
	29	2	DA	DA	17,3	45.757591, 16.304306
	30	2	DA	DA	13,6	45.757376, 16.303929

Lokacija	Stablo (broj/oznaka)	Kategorija zdravstvenog stanja	Nekroze na korijenu	Nekroze na deblu	Promjer (cm)	Koordinate
Lipovljani GJ J.Kozarac 74a	31	1	NE	NE	20,5	45.399944, 16.799439
	32	1	DA	NE	30,5	45.400143, 16.799003
	33	1	DA	NE	25,9	45.400354, 16.798511
	34	1	DA	NE	26,7	45.400374, 16.798894
	35	1	NE	DA	12,4	45.400524, 16.798547
Lipovljani GJ J.Kozarac 74b	36	2	NE	DA	14,2	45.402268, 16.796528
	37	1	DA	NE	16,4	45.402219, 16.796343
	38	1	DA	NE	14,1	45.402412, 16.796316
	39	2	DA	DA	15,1	45.402486, 16.796554
	40	3	DA	DA	14,4	45.402432, 16.796760
Lipovljani GJ J.Kozarac 80a	41	2	DA	NE	16,7	45.397746, 16.800999
	42	2	DA	DA	27,6	45.398011, 16.801119
	43	3	DA	NE	28,6	45.398169, 16.801102
	44	3	DA	DA	22,4	45.397967, 16.801408
	45	3	DA	DA	16,9	45.397792, 16.801387
Lipovljani GJ J.Kozarac 71d	46	2	DA	DA	27,6	45.393203, 16.780236
	47	3	DA	DA	25,2	45.392964, 16.780088
	48	3	DA	DA	21,4	45.392620, 16.780119
	49	3	DA	DA	26,2	45.392477, 16.780080
	50	2	DA	DA	25,0	45.392533, 16.779864
	51	2	DA	NE	27,9	45.392873, 16.780551
	52	1	NE	NE	34,0	45.392775, 16.780403
	53	3	DA	DA	26,0	45.392548, 16.780155
	54	1	NE	NE	28,5	45.392493, 16.779964
	55	3	DA	DA	31,8	45.392460, 16.780077
	56	2	NE	NE	28,6	45.392267, 16.780211
	57	1	NE	NE	31,7	45.392277, 16.780253
	58	3	DA	DA	31,7	45.392595, 16.780203
	59	2	DA	DA	36,5	45.392476, 16.780179
	60	2	DA	DA	36,0	45.392565, 16.780292

Lokacija	Stablo (broj/oznaka)	Kategorija zdravstvenog stanja	Nekroze na korijenu	Nekroze na deblu	Promjer (cm)	Koordinate
Novska GJ Trstika 37b	61	3	DA	DA	25,2	45.312767, 16.927337
	62	3	DA	DA	20,1	45.312820, 16.927435
	63	3	DA	DA	18,6	45.312667, 16.927424
	64	2	NE	NE	20,9	45.312596, 16.927787
	65	1	DA	NE	23,0	45.312728, 16.927636
	66	2	DA	NE	20,3	45.313112, 16.927476
	67	1	NE	NE	22,4	45.313140, 16.927574
	68	1	DA	NE	20,7	45.313237, 16.927272
	69	3	DA	DA	16,4	45.313514, 16.927756
	70	1	NE	DA	19,9	45.313619, 16.927427
	71	2	DA	NE	22,4	45.313588, 16.927853
	72	1	NE	NE	25,3	45.313849, 16.927740
	73	2	DA	DA	19,8	45.313983, 16.927658
	74	1	NE	NE	26,3	45.313841, 16.927682
	75	3	DA	NE	16,6	45.313410, 16.927850
	76	1	NE	NE	19,9	45.312550, 16.927841
	77	2	DA	DA	31,7	45.312986, 16.928079
	78	3	DA	DA	29,5	45.312739, 16.928232
	79	1	DA	NE	27,7	45.312923, 16.928330
	80	2	DA	DA	21,8	45.312883, 16.928197
	81	3	DA	DA	20,2	45.312811, 16.927774
	82	3	DA	DA	22,5	45.313028, 16.927970
	83	2	DA	DA	17,1	45.312877, 16.927989
	84	2	DA	DA	21,6	45.312929, 16.927937
	85	1	DA	NE	22,5	45.313062, 16.927796
	86	1	NE	DA	33,1	45.312554, 16.928517
	87	2	DA	DA	27,7	45.312452, 16.928408
	88	3	DA	DA	24,6	45.312598, 16.928470
	89	2	DA	DA	17,8	45.312685, 16.928672
	90	3	DA	DA	28,4	45.312600, 16.928305

Legenda:

Stabla zdravstvene kategorije 1 osutost krošnje < 25 %	*Stabla zdravstvene kategorije 2 osutost krošnje 26-60 %*	*Stabla zdravstvene kategorije 3 osutost krošnje 61-99 %*

Prilog 2. Popis identificiranih taksona kategoriziranih prema sistematskoj pripadnosti odjelu te kategoriji načina života i ishrane

Identifikacijski broj sekvence u NCBI GenBank	Vrsta najveće podudarnosti sekvence prema BLAST algoritmu	Identifikacijski broj podudarajuće sekvence u NCBI GenBank	Podudarnost sekvenci	Sistematska pripadnost odjelu	Kategorija načina života i ishrane	Komentar (citat izvora literature)
KY977569	*Absidia* sp.	JN205822.1	95%	*Zygomycota*	saprotrof	(Deacon 2013)
KY977531	*Acremonium murorum*	AB540543.1	99%	*Ascomycota*	endofit	(Moricca i sur. 2012)
KY977546	*Alternaria* sp.	KX768144.1	100%	*Ascomycota*	endofit	(Martín-García i sur. 2011)
KY977555	*Amauroascus albicans*	NR_111883.1	99%	*Ascomycota*	NP	-
KY977587	*Armillaria* spp.	GU934598.1	99%	*Basidiomycota*	parazit	(Lygis i sur. 2005)
KY977532	*Aspergillus ruber*	DQ778909.1	99%	*Ascomycota*	parazit	na sjemenu soje (Dhingra i sur. 2001)
KY977586	*Beauveria bassiana*	LN808999.1	100%	*Ascomycota*	endofit	entomopatogena (Vega i sur. 2008)
KY977578	*Cadophora* sp.	LC133830.1	99%	*Ascomycota*	NP	vrste ovog roda dolaze na trulom drvu, u tlu ili u biljkama, na vinovoj lozi mogu biti patogeni (Gramaje i sur. 2011)
KY977574	*Chaetomium funicola*	KM979902.1	99%	*Ascomycota*	endofit	(Eshel i Beeckman 2013)
KY977547	*Chaetosphaeriaceae* sp.	GU327452.1	98%	*Ascomycota*	NP	-
KY977538	*Cladosporium cladosporioides*	KX463059.1	99%	*Ascomycota*	endofit	(Kowalski i Kehr 1992)

Identifikacijski broj sekvence u NCBI GenBank	Vrsta najveće podudarnosti sekvence prema BLAST algoritmu	Identifikacijski broj podudarajuće sekvence u NCBI GenBank	Podudarnost sekvenci	Sistematska pripadnost odjelu	Kategorija načina života i ishrane	Komentar (citat izvora literature)
KY977560	*Clonostachys candelabrum*	LT635436.1	99%	*Ascomycota*	saprotrof	(Schroers i sur. 1999)
KY977607	*Clonostachys rosea*	KT215192.1	99%	*Ascomycota*	endofit	entomopatogena (Vega i sur. 2008)
KY977567	*Colletotrichum truncatum*	KU516448.1	100%	*Ascomycota*	endofit	zdrave peteljke običnog jasena, inače patogen na poljoprivrednim kulturama (Davydenko i sur. 2013)
KY977599	*Coprinellus disseminatus*	GU934591.1	99%	*Basidiomycota*	saprotrof	(Gáperová i sur. 2015)
KY977600	*Coprinellus micaceus*	HQ604762.1	99%	*Basidiomycota*	saprotrof	(Gáperová i sur. 2015)
KY977552	*Coprinellus radians*	FJ185160.1	99%	*Basidiomycota*	saprotrof	(Liers i sur. 2011)
KY977595	*Dactylonectria vitis*	JF735303.1	99%	*Ascomycota*	parazit	na vinovoj lozi (Cabral i sur. 2012)
KY977577	*Daldinia pyrenaica*	KY610413.1	99%	*Ascomycota*	NP	-
KY977583	*Diaporthe cotoneastri*	KC145903.1	99%	*Ascomycota*	parazit	(Abreo i sur. 2012)
KY977582	*Dimorphospora foliicola*	KT184712.1	98%	*Ascomycota*	saprotrof	(Gönczöl i Révay 2003)
KY977575	*Epicoccum nigrum*	JN689342.1	100%	*Ascomycota*	endofit	(Kowalski i Kehr 1992)
KY977554	*Fontanospora* sp.	KP234355.1	96%	*Ascomycota*	NP	-

Identifikacijski broj sekvence u NCBI GenBank	Vrsta najveće podudarnosti sekvence prema BLAST algoritmu	Identifikacijski broj podudarajuće sekvence u NCBI GenBank	Podudarnost sekvenci	Sistematska pripadnost odjelu	Kategorija načina života i ishrane	Komentar (citat izvora literature)
KY977568	*Fusarium solani*	KT336512.1	99%	*Ascomycota*	parazit	(Rajput i sur. 2008)
KY977588	*Fusarium sporotrichioides*	KU516465.1	99%	*Ascomycota*	parazit	(Ivanová i sur. 2016)
KY977553	*Ganoderma adspersum*	AM906057.1	99%	*Basidiomycota*	parazit	(Schwarze i Ferner 2003)
KY977533	*Gibberella baccata*	AF310980.1	99%	*Ascomycota*	endofit	(Griffith i Boddy 1990)
KY977579	*Gibberella fujikuroi*	JX915249.1	99%	*Ascomycota*	parazit	na poljoprivrednim kulturama, pretežno riža (Hsuan i sur. 2011)
KY977589	*Gongronella butleri*	GU966508.1	99%	*Zygomycota*	saprotrof	(Tsuneo 2002)
KY977585	*Gongronella* sp.	KC462739.1	97%	*Zygomycota*	saprotrof	(Tsuneo 2002)
KY977559	*Hymenoscyphus fraxineus*	KX255648.1	99%	*Ascomycota*	parazit	(Kowalski i Holdenrieder 2009)
KY977593	*Hypoxylon perforatum*	KY610391.1	99%	*Ascomycota*	saprotrof	(Ju i Rogers 1996)
KY977528	*Ilyonectria robusta*	KX438333.1	99%	*Ascomycota*	endofit	endofit korijena, oportunistički patogen http://genome.jgi.doe.gov/Ilyrob1/Ilyrob1.home.html
KY977592	*Lecanicillium lecanii*	KM678344.1	99%	*Ascomycota*	endofit	(Giordano i sur. 2009)
KY977535	*Leucostoma persoonii*	HM061319.1	99%	*Ascomycota*	parazit	odumiranje izbojaka i grana, rak kore i odumiranje stabala koštuničavog voća (*Prunus* spp.) (Romanazzi i sur. 2012)

Identifikacijski broj sekvence u NCBI GenBank	Vrsta najveće podudarnosti sekvence prema BLAST algoritmu	Identifikacijski broj podudarajuće sekvence u NCBI GenBank	Podudarnost sekvenci	Sistematska pripadnost odjelu	Kategorija načina života i ishrane	Komentar (citat izvora literature)
KY977543	*Metacordyceps chlamydosporia*	AB214654.1	100%	*Ascomycota*	endofit	parazit nematoda (Eshel i Beeckman 2013)
KY977566	*Metapochonia bulbillosa*	DQ132810.1	99%	*Ascomycota*	saprotrof	(Girlanda i sur. 1995)
KY977596	*Metarhizium marquandii*	AB099511.1	99%	*Ascomycota*	endofit	(Lu i sur. 2012)
KY977597	*Metarhizium robertsii*	KU983799.1	99%	*Ascomycota*	endofit	(Ramanpreet 2012)
KY977605	*Microdiplodia* sp.	EU273508.1	96%	*Ascomycota*	endofit	(Pirttilä i Frank 2011)
KY977563	*Mortierellomycotina* sp.	KF624810.1	99%	*Zygomycota*	saprotrof	(Wagner i sur. 2013)
KY977571	*Mucor* sp.	KU556552.1	99%	*Zygomycota*	saprotrof	(Voříšková i sur. 2014)
KY977561	*Nectria canadensis*	GQ280556.1	99%	*Ascomycota*	NP	-
KY977550	*Nectria flavoviridis*	HQ897791.1	99%	*Ascomycota*	endofit	(Banik i sur. 2012)
KY977591	*Nemania serpens*	KU141386.1	99%	*Ascomycota*	endofit	(Haňáčková i sur. 2017)
KY977540	*Nemania* sp.	AF201720.2	97%	*Ascomycota*	endofit	(Stone i sur. 2004)
KY977602	*Neobulgaria* sp..	KR072504.1	99%	*Ascomycota*	endofit	(Beug i sur. 2014)

Identifikacijski broj sekvence u NCBI GenBank	Vrsta najveće podudarnosti sekvence prema BLAST algoritmu	Identifikacijski broj podudarajuće sekvence u NCBI GenBank	Podudarnost sekvenci	Sistematska pripadnost odjelu	Kategorija načina života i ishrane	Komentar (citat izvora literature)
KY977529	*Neonectria punicea*	KX620770.1	99%	*Ascomycota*	endofit	(Ginting i sur. 2013)
KY977537	*Neonectria* sp.	HG936819.1	99%	*Ascomycota*	NP	-
KY977541	*Paraphaeosphaeria neglecta*	JX496037.1	99%	*Ascomycota*	saprotrof	oportunistički patogen (Verkley i sur. 2014)
KY977581	*Paraphaeosphaeria sporulosa*	JX496084.1	100%	*Ascomycota*	saprotrof	raširena i česta u tlu (Verkley i sur. 2014)
KY977551	*Penicillium atrosanguineum*	JN617662.1	99%	*Ascomycota*	NP	-
KY977558	*Penicillium glabrum*	GU565126.1	100%	*Ascomycota*	endofit	(Nicoletti i sur. 2014)
KY977590	*Penicillium ochrochloron*	AY213675.1	100%	*Ascomycota*	endofit	(Nicoletti i sur. 2014)
KY977603	*Penicillium simplicissimum*	KF906546.1	99%	*Ascomycota*	endofit	(Nicoletti i sur. 2014)
KY977530	*Penicillium* sp.1	FN868482.1	97%	*Ascomycota*	NP	-
KY977557	*Penicillium* sp.2	JN942850.1	96%	*Ascomycota*	NP	
KY977576	*Pezicula ericae*	KR859174.1	100%	*Ascomycota*	endofit	(Chen i sur. 2016)
KY977594	*Pezicula melanigena*	KR859211.1	99%	*Ascomycota*	endofit	na korijenu *Quercus petraea* u Austriji (Kowalski i sur. 1998)

Identifikacijski broj sekvence u NCBI GenBank	Vrsta najveće podudarnosti sekvence prema BLAST algoritmu	Identifikacijski broj podudarajuće sekvence u NCBI GenBank	Podudarnost sekvenci	Sistematska pripadnost odjelu	Kategorija načina života i ishrane	Komentar (citat izvora literature)
KY977580	*Pezicula* sp.	AF141181.1	97%	*Ascomycota*	endofit	(Stone i sur. 2004)
KY977544	*Pholiota adiposa*	AB470888.1	99%	*Basidiomycota*	parazit	(Noordeloos i sur. 1999)
KY977606	*Pleosporales* sp.	JN835208.1	99%	*Ascomycota*	NP	-
KY977549	*Podospora* sp.	EU273519.1	100%	*Ascomycota*	saprotrof	(Melo i sur. 2015)
KY977573	*Psathyrella candolleana*	FN396114.1	99%	*Basidiomycota*	saprotrof	(Menkis i sur. 2006)
KY977542	*Pseudeurotium bakeri*	KP055601.1	99%	*Ascomycota*	endofit	(Tejesvi i sur. 2011)
KY977601	*Pseudogymnoascus* sp.	KF039897.1	100%	*Ascomycota*	saprotrof	(Rice i Currah 2006)
KY977536	*Pseudopithomyces chartarum*	KM979510.1	100%	*Ascomycota*	endofit	debla vizualno zdravih sivih joha (*Alnus incana*) (Arhipova i sur. 2011)
KY977565	*Purpureocillium lilacinum*	HQ607867.1	99%	*Ascomycota*	endofit	patogen na nematodama (Castillo Lopez i sur. 2014)
KY708964 KY708965 KY708963 KY708962 KY708961 KY707823	*Pythium*/*Phytopythium* spp.	AY197328.1 AY197328.1 AY197328.1 KU961901.1 KU209134.1 AY598650.1	99% 99% 99% 95% 99% 99%	*Oomycota*	parazit	(Oßwald i sur. 2001) (Jankowiak i sur. 2015) (Akilli i sur. 2013a)
KY977598	*Talaromyces purpureogenus*	AB872822.1	99%	*Ascomycota*	saprotrof	(Crawford i sur. 1990)

Identifikacijski broj sekvence u NCBI GenBank	Vrsta najveće podudarnosti sekvence prema BLAST algoritmu	Identifikacijski broj podudarajuće sekvence u NCBI GenBank	Podudarnost sekvenci	Sistematska pripadnost odjelu	Kategorija načina života i ishrane	Komentar (citat izvora literature)
KY977604	*Talaromyces ucrainicus*	JN899355.1	99%	*Ascomycota*	endofit	(Sánchez Márquez i sur. 2007)
KY977539	*Talaromyces verruculosus*	HQ608025.1	99%	*Ascomycota*	endofit	(Yu i sur. 2016)
KY977572	*Tolypocladium album*	KU516596.1	99%	*Ascomycota*	endofit	(Gazis i sur. 2014)
KY977548	*Tolypocladium cylindrosporum*	AB208110.1	98%	*Ascomycota*	endofit	entomopatogena (Herrero Asensio i sur. 2013)
KY977556	*Trametes versicolor*	KR261581.1	100%	*Basidiomycota*	saprotrof	(Boddy i sur. 2007)
KY977562 KY977534	*Trichoderma* spp.	KR856225.1 KM491888.1	99% 99%	*Ascomycota*	saprotrof	često antagonisti drugih gljiva (Schuster i Schmoll 2010)
KY977545	*Verticillium leptobactrum*	LN808852.1	99%	*Ascomycota*	endofit	(Pacioni i sur. 2007)
KY977570	*Westerdykella purpurea*	FJ624258.1	99%	*Ascomycota*	saprotrof	(Ebead i sur. 2012)
KY977564	*Xylaria polymorpha*	KY610408.1	99%	*Ascomycota*	saprotrof	(Boddy i sur. 2007)
KY977584	*Xylaria primorskensis*	JX160062.1	99%	*Ascomycota*	saprotrof	(Ju i sur. 2009)

Prilog 3. Broj izolata identificiranih taksona s obzirom na kategoriju uzorka, kategoriju zdravstvenog stanja stabla i geografsku lokaciju uzorkovanja

Naziv identificiranog taksona	Dugo Selo									Lipovljani									Novska									Ukupan broj izolata
	Zdrav. kat. 1			Zdrav. kat. 2			Zdrav. kat. 3			Zdrav. kat. 1			Zdrav. kat. 2			Zdrav. kat. 3			Zdrav. kat. 1			Zdrav. kat. 2			Zdrav. kat. 3			
	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	
Ilyonectria robusta	0	**12**	**1**	**2**	**12**	**1**	0	**18**	0	0	**16**	0	0	**8**	0	0	**13**	**1**	**1**	**10**	**2**	**2**	**10**	0	0	**8**	0	117
Pezicula melanigena	0	**5**	0	0	**4**	0	0	**1**	0	0	**2**	0	0	**2**	0	0	0	0	0	**1**	0	0	**2**	**1**	0	**1**	0	19
Neonectria sp.	0	0	**1**	**1**	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	5
Absidia sp.	**1**	0	**8**	**2**	0	**12**	**4**	0	**8**	0	**1**	**7**	**1**	**1**	**10**	0	**1**	**7**	0	**4**	**10**	**1**	**2**	**7**	**1**	**2**	**19**	109
Tolypocladium cylindrosporum	0	0	0	0	**1**	**2**	0	0	**3**	0	0	**1**	0	**4**	**2**	0	0	**2**	0	0	**1**	0	0	0	0	0	**1**	17
Gibberella fujikuroi	0	**1**	**1**	0	**2**	**3**	0	**1**	**3**	**1**	0	0	0	0	**1**	0	0	0	**1**	0	0	**1**	**1**	**1**	0	0	0	17
Mortierellomycotina sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	**5**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
Psathyrella candolleana	0	**1**	0	0	**4**	0	0	0	**1**	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	0	**1**	0	0	**4**	0	0	0	0	12
Diaporthe cotoneastri	**2**	**3**	0	**7**	**7**	0	**1**	**2**	0	**2**	**8**	0	0	**1**	0	0	**2**	0	**2**	**9**	**1**	0	**5**	0	**2**	**6**	0	60
Neonectria punicea	**2**	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	0	**1**	0	**1**	0	0	**2**	0	0	0	0	0	0	0	0	**2**	0	9
Clonostachys rosea	**1**	**1**	**6**	0	**3**	**5**	**1**	**6**	**3**	0	**3**	**1**	**1**	**1**	0	0	**1**	**3**	0	**1**	**1**	0	**1**	0	0	0	**3**	42
Epicoccum nigrum	0	**1**	**1**	0	0	**1**	0	0	0	**2**	**2**	**1**	**2**	**1**	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	13
Cladosporium cladosporioides	**4**	**8**	**2**	**1**	**4**	0	**2**	**4**	**4**	**7**	**12**	**2**	0	**4**	0	0	**12**	0	**2**	**3**	0	**1**	**9**	0	0	0	0	81
Podospora sp.	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Cadophora sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	0	0	**8**	0	9
Penicillium ochrochloron	**2**	0	**2**	**1**	**3**	**2**	**2**	0	**5**	**1**	0	**4**	**1**	0	**4**	0	**1**	**1**	**2**	0	**1**	**1**	**2**	**3**	**1**	0	**2**	41
Purpureocillium lilacinum	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**6**	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	8

Naziv identificiranog taksona	Dugo Selo									Lipovljani									Novska									Ukupan broj izolata
	Zdrav. kat. 1			Zdrav. kat. 2			Zdrav. kat. 3			Zdrav. kat. 1			Zdrav. kat. 2			Zdrav. kat. 3			Zdrav. kat. 1			Zdrav. kat. 2			Zdrav. kat. 3			
	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	
Beauveria bassiana	**2**	**1**	0	0	0	**1**	**1**	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	0	0	**1**	0	**4**	0	0	0	0	0	0	11
Metarhizium marquandii	0	0	0	0	0	**1**	0	0	**5**	0	0	**2**	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	0	0	0	9
Acremonium murorum	0	0	0	0	0	**1**	0	**1**	0	0	0	**2**	0	0	**2**	**2**	0	**3**	0	0	**1**	0	**2**	**1**	0	0	**1**	16
Hymenoscyphus fraxineus	0	0	0	0	**3**	0	**2**	**14**	0	**1**	0	0	0	**4**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24
Armillaria spp.	0	0	0	**1**	0	0	**2**	**5**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**5**	0	**3**	**4**	0	**3**	**12**	0	35
Metarhizium robertsii	0	0	**1**	0	**1**	**1**	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	0	0	0	5
Pseudeurotium bakeri	**5**	0	0	0	0	0	**3**	0	0	0	0	**5**	0	**2**	**1**	**1**	0	**1**	0	**1**	**1**	0	0	0	0	**2**	**3**	25
Ganoderma adspersum	0	0	0	**4**	**4**	0	**3**	0	0	0	**2**	**1**	**2**	**2**	0	**1**	**1**	0	**1**	0	**1**	0	0	**1**	0	0	**1**	24
Fusarium solani	0	**3**	**4**	**1**	**11**	**2**	**5**	**5**	**2**	0	**4**	0	**4**	**9**	0	0	**6**	0	0	**8**	**4**	**2**	**15**	**2**	0	**11**	**3**	101
Pholiota adiposa	0	0	0	0	0	**2**	0	0	0	0	0	**3**	**1**	0	**2**	0	0	0	0	0	**1**	0	**1**	0	0	0	0	10
Fusarium sporotrichioides	**1**	**1**	**3**	**1**	0	0	0	**3**	**1**	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	**1**	0	0	13
Talaromyces purpureogenus	0	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	**1**	0	**1**	0	5
Xylaria polymorpha	**1**	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Chaetomium funicola	0	**1**	**1**	0	**2**	**1**	0	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
Penicillium sp. 1	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	**3**	0	0	**1**	**1**	0	**2**	0	**1**	0	0	0	**2**	0	0	0	0	0	11
Aspergillus ruber	**2**	0	**1**	**1**	**2**	0	0	0	0	0	**1**	**1**	0	0	0	0	0	**1**	**2**	0	**1**	**1**	0	0	**2**	0	0	15
Penicillium sp. 2	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	0	**1**	0	**1**	0	**3**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
Talaromyces ucrainicus	**7**	0	0	**1**	0	0	**1**	0	0	**2**	0	0	**3**	0	0	**8**	0	0	**9**	0	0	**2**	0	0	0	0	0	33

Naziv identificiranog taksona	Dugo Selo									Lipovljani									Novska									Ukupan broj izolata
	Zdrav. kat. 1			Zdrav. kat. 2			Zdrav. kat. 3			Zdrav. kat. 1			Zdrav. kat. 2			Zdrav. kat. 3			Zdrav. kat. 1			Zdrav. kat. 2			Zdrav. kat. 3			
	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	
Talaromyces verruculosus	**2**	0	0	**1**	0	0	0	0	0	**3**	0	0	**7**	0	0	**6**	0	0	**2**	0	**1**	**3**	0	**1**	0	0	0	26
Xylaria primorskensis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	1
Microdiplodia sp.	0	0	0	0	0	0	0	**4**	**1**	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	0	7
Hypoxylon perforatum	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Paraphaeosphaeria neglecta	**1**	**1**	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	4
Penicillium atrosanguineum	0	0	**1**	**2**	0	**1**	0	0	0	0	0	0	**1**	0	**1**	**2**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8
Coprinellus radians	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Nectria flavoviridis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	1
Gibberella baccata	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	2
Pezicula sp.	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Metacordyceps chlamydosporia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	1
Fontanospora sp.	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Tolypocladium album	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	3
Clonostachys candelabrum	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	2
Dimorphospora foliicola	0	0	0	0	**1**	0	0	**2**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
Gongronella butleri	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	0	0	0	2
Coprinellus disseminatus	**1**	**1**	0	0	**1**	0	0	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**3**	0	**1**	0	**4**	0	0	0	0	12

Naziv identificiranog taksona	Dugo Selo									Lipovljani									Novska									Ukupan broj izolata
	Zdrav. kat. 1			Zdrav. kat. 2			Zdrav. kat. 3			Zdrav. kat. 1			Zdrav. kat. 2			Zdrav. kat. 3			Zdrav. kat. 1			Zdrav. kat. 2			Zdrav. kat. 3			
	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	
Coprinellus micaceus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	**3**	0	**1**	**5**	0	0	**7**	0	**1**	**7**	0	**1**	**2**	0	28
Verticillium leptobactrum	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Amauroascus albicans	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	2
Gongronella sp.	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Metapochonia bulbillosa	**1**	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Dactylonectria vitis	0	0	0	0	0	0	0	**2**	0	0	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	**1**	0	5
Pleosporales sp.	0	**1**	0	0	0	0	**1**	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
Nemania sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	0	0	**3**	**1**	5
Pseudopithomyces chartarum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**2**	**1**	0	**1**	4
Neobulgaria sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**2**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Lecanicillium lecanii	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	0	0	2
Chaetosphaeriaceae sp.	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Nectria canadensis	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Westerdykella purpurea	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Paraphaeosphaeria sporulosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Nemania serpens	**3**	0	0	0	**1**	0	**4**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8
Pseudogymnoascus sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	0	0	0	**2**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3

Naziv identificiranog taksona	Dugo Selo									Lipovljani									Novska									Ukupan broj izolata
	Zdrav. kat. 1			Zdrav. kat. 2			Zdrav. kat. 3			Zdrav. kat. 1			Zdrav. kat. 2			Zdrav. kat. 3			Zdrav. kat. 1			Zdrav. kat. 2			Zdrav. kat. 3			
	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	
Penicillium simplicissimum	0	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Daldinia pyrenaica	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	1
Leucostoma persoonii	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	0	1
Colletotrichum truncatum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	0	1
Penicillium glabrum	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Pezicula ericae	0	0	0	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Alternaria sp.	**2**	**1**	0	**1**	**1**	**2**	0	0	0	**2**	**1**	**1**	0	0	0	**3**	**1**	**1**	**2**	0	0	0	0	0	0	0	**1**	19
Trametes versicolor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Trichoderma spp.	**4**	**3**	**10**	**9**	**1**	**8**	**5**	**2**	**15**	**3**	**6**	**14**	**11**	**20**	**10**	**9**	**13**	**11**	**7**	**5**	**9**	**7**	**1**	**16**	**18**	**10**	**11**	238
Mucor sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**4**	0	0	**3**	0	0	**1**	0	0	0	0	0	0	8
Pythium/Phytopythium spp.	0	0	**19**	0	0	**12**	0	0	**16**	0	0	**21**	0	0	**14**	0	0	**22**	0	0	**22**	0	0	**14**	0	0	**21**	161

Legenda:

Zdrav. kat. 1 – stabla osutosti krošnje < 25 %; Zdrav. kat. 2 – stabla osutosti krošnje 26-60 %; Zdrav. kat. 3 – stabla osutosti krošnje 61-99 %

D – deblo, K – korijen, T – tlo

- *takson dolazi samo u vizualno zdravom tkivu*
- *takson dolazi i u vizualno zdravom i u simptomatičnom tkivu*
- *takson dolazi samo u simptomatičnom tkivu*

ŽIVOTOPIS

Jelena Kranjec rođena je 20. kolovoza 1987. godine u Zagrebu. Nakon završenog srednjoškolskog obrazovanja smjer opća gimnazija u Svetom Ivanu Zelini, 2006. godine upisuje Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, gdje završava preddiplomski studij smjer Šumarstvo 2009. godine te diplomski studij smjer Tehnika, tehnologija i management u šumarstvu 2011. godine.

Od siječnja do rujna 2012. godine radi kao asistentica na Zavodu za šumarske tehnike i tehnologije Šumarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu kao zamjena za djelatnicu na rodiljnom dopustu. Od ožujka 2013. godine odrađuje jednogodišnji pripravnički staž u šumariji Vrbovec poduzeća Hrvatske šume d.o.o., nakon čega se u travnju 2014. zapošljava u šumariji Dugo Selo istog poduzeća na radno mjesto pomoćnice revirnika. U listopadu 2014. godine počinje raditi kao asistentica na Zavodu za zaštitu šuma i lovno gospodarenje Šumarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, gdje u prosincu iste godine upisuje poslijediplomski doktorski studij Šumarstvo i drvna tehnologija.

Tijekom trogodišnjeg doktorskog studija kao autorica ili suautorica objavljuje dva znanstvena rada i sudjeluje na tri međunarodne i šest domaćih konferencija i radionica.

Kao suradnica sudjeluje na domaćim znanstvenim projektima Ministarstva poljoprivrede pod nazivima „Integrirana zaštita šumskih ekosustava krša Hrvatske u promijenjenim klimatskim uvjetima“ te „Ekologija i obnova poplavnih šuma Posavine“ i Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom FRAXINPRO „Uloga biotičkih čimbenika na vitalnost poljskoga jasena (*Fraxinus angustifolia* Vahl) u poplavnim šumama Hrvatske“.

Aktivno se služi engleskim te pasivno njemačkim jezikom.

Članica je Hrvatskog šumarskog društva ogranak Zagreb te Hrvatskog društva biljne zaštite.

AUTORIČIN POPIS OBJAVLJENIH RADOVA I SUDJELOVANJA

Objavljen znanstveni rad u časopisu A1 skupine

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

2. Diminić, D., Kajba, D., Milotić, M., Andrić, I., **Kranjec, J.**, 2017: Susceptibility of *Fraxinus angustifolia* clones to *Hymenoscyphus fraxineus* in lowland Croatia. Baltic Forestry 23 (1): 233-243.

Izlaganje na međunarodnom znanstvenom skupu (A3 skupina)

1. **Kranjec, J.**, Milošić, L., Kolar, A., Milotić, M., Diminić, D., 2016: New insights on *Dothistroma* needle blight on pine species in Croatia. GREEN 2 - Natural resources, green technology & sustainable development. Zagreb, Hrvatska, 5.-7.10.2016.

2. Milotić, M., **Kranjec, J.**, Diminić, D., 2016: Current status of ash dieback disease *Hymenoscyphus fraxineus* in Croatia. GREEN 2 - Natural resources, green technology & sustainable development. Zagreb, Hrvatska, 5.-7.10.2016.

3. Diminić, D., Kajba, D., Milotić, M., Andrić, I., **Kranjec, J.**, 2016: Susceptibility of *Fraxinus angustifolia* Clones to *Hymenoscyphus fraxineus* in Lowland Croatia. COST FRAXBACK Final Conference, Riga, Latvija, 29.-31.3.2016.

Izlaganje na domaćem znanstvenom skupu

1. Diminić, D., Devčić Buzov, I., **Kranjec, J.**, Milotić, M., 2015: Research update on *Mycosphaerella dearnessii* Barr. on *Pinus halepensis* Mill. in Croatia. European Mycological Network (EMN) 18th annual meeting, Ljubljana, Slovenija, 21.-23.4.2015.

2. Glavaš, M., **Kranjec, J.**, 2015: Sušenje izbojaka božikovine uzrokovano gljivom *Vialaea insculpta* (Fr.) Sacc. XII Simpozij o zaštiti bilja, Društvo za zaštitu bilja u Bosni i Hercegovini, Mostar, BiH, 3.-5.11.2015.

3. Glavaš, M., **Kranjec, J.**, 2016: Prvi nalaz bolesti izbojaka i lišća božikovine u Hrvatskoj i druge mikoze. 60. seminar biljne zaštite, Hrvatsko društvo biljne zaštite, Opatija, Hrvatska, 9.-12.2.2016.

4. **Kranjec, J.**, Milotić, M., Diminić, D., 2016: Uloga gljiva i gljivama sličnih organizama u odumiranju poljskog jasena (*Fraxinus angustifolia* Vahl) u posavskim nizinskim šumama Hrvatske. Radionica projekta HRZZ FRAXINPRO, Zagreb, Hrvatska, 6.5.2016.

5. Milotić, M., **Kranjec, J.**, Diminić, D., 2016: Morfološka i genetička obilježja te patogenost gljive *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya kao uzročnik odumiranja poljskog jasena (*Fraxinus angustifolia* Vahl) u Hrvatskoj. Radionica projekta HRZZ FRAXINPRO, Zagreb, Hrvatska, 6.5.2016.

6. **Kranjec, J.**, Milotić, M., Milošić, L., Kolar, A., Diminić, D., 2017: Rasprostranjenost uzročnika crvene pjegavosti borovih iglica na području Istre i šumarije Đurđevac. 61. Seminar biljne zaštite, Hrvatsko društvo biljne zaštite, Opatija, Hrvatska, 7.-10.2.2017.

7. Milotić, M., **Kranjec, J.**, Damić, M., Diminić, D., 2017: Parametri rasta i fruktifikacija izolata gljive *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya prilikom izloženosti djelovanju ultravioletnih zraka svjetlosti. 61. Seminar biljne zaštite, Hrvatsko društvo biljne zaštite, Opatija, Hrvatska, 7.-10.2.2017.

8. **Kranjec, J.**, Milotić, M., Diminić, D., 2017: Studies on declining *Fraxinus angustifolia* stands: Fungus-like organisms in the soil. European Mycological Network (EMN) 20th annual meeting, Zagreb, Hrvatska, 24.-26.4.2017.

Znanstveno i stručno usavršavanje u inozemstvu

COST Action DIAROD FP1102 Training school on bioinformatics/biostatistics, University of Valladolid, Palencia, Španjolska, 21.-24.7.2015.