

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA GOZDARSTVO IN
OBNOVLJIVE GOZDNE VIRE

Katarina FLAJŠMAN

**ZNAČILNOSTI RASTI IZOLATOV GLIVE *Chalara*
fraxinea IN VPLIV RAZLIČNIH GOJIŠČ**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA GOZDARSTVO IN OBNOVLJIVE GOZDNE VIRE

Katarina FLAJŠMAN

**ZNAČILNOSTI RASTI IZOLATOV GLIVE *Chalara fraxinea* IN
VPLIV RAZLIČNIH GOJIŠČ**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**GROWTH CHARACTERISTICS OF *Chalara fraxinea* ISOLATES AND
EFFECTS OF CULTURE MEDIA**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija gozdarstva in obnovljivih gozdih virov. Opravljeno je bilo na Katedri za varstvo gozdov in ekologijo prostoživečih živali Oddelka za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani in na Oddelku za varstvo gozdov Gozdarskega inštituta Slovenije. Laboratorijsko delo je potekalo na Gozdarskem inštitutu Slovenije, v Laboratoriju za varstvo gozdov.

Komisija za študijska in študentska vprašanja Oddelka za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire BF je dne 15. 6. 2011 sprejela temo in za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Dušana Jurca, za recenzenta pa prof. dr. Roberta Brusa.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Katarina Flajšman

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	GDK 443(497.4)+(438)(043.2)=163.6
KG	jesenov ožig/jesen/ <i>Fraxinus</i> / <i>Hymenoscyphus</i> <i>pseudoalbidus</i> /Slovenija/Poljska
KK	
AV	FLAJŠMAN, Katarina
SA	JURC, Dušan (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 83
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire
LI	2011
IN	ZNAČILNOSTI RASTI IZOLATOV GLIVE <i>Chalara fraxinea</i> IN VPLIV RAZLIČNIH GOJIŠČ
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP	X, 56 str., 4 pregl., 29 sl., 2 pril., 24 vir.
IJ	Sl
JJ	sl/en
AI	

Raziskovali so hitrost rasti glive *Chalara fraxinea* v čisti kulturi. Poskus je obsegal 12 različnih glivnih izolatov (6 iz Poljske, 6 iz Slovenije) na 8 vrstah gojišč (sladni agar, sladni agar s streptomycin sulfatom, krompirjev agar, vodni agar, Czapek agar, agar z bukvijo, agar z malim jesenom in agar z velikim jesenom) v 3 ponovitvah. Meritve premerov glivnih kolonij so opravljali 8 tednov. Izračunali so hitrosti rasti izolatov gliv na vseh vrstah gojišč in naredili statistično analizo z enosmerno analizo variance ter Kruskal-Wallisovim testom. Opravili so izolacijo glive iz lesa 3–4-letnih drevesc velikega jesena (*Fraxinus excelsior*), ki so kazali znake jesenovega ožiga. Rezultati poskusa so pokazali, da obstaja velika variabilnost hitrosti rasti posameznih izolatov in na različnih gojiščih. Zakonitosti hitrosti rasti med izolati na različnih gojiščih niso jasno definirane. Na gojiščih, pripravljenih z lesom izbranih drevesnih vrst, in na krompirjevem agarju je bila rast najhitrejša. Rast glive na gojiščih, pripravljenih iz izvlečkov lesa, ni dober kazalec dovzetnosti drevesne vrste za okužbo z glivo, saj je gliva dobro priraščala na gojišču z bukovim lesom. Slovenski izolati so na večini gojišč rasli hitreje kot poljski, verjetno zato, ker so bili starejši. Relativno počasna rast glive na sladnem agarju je bila primerljiva z navedbami v literaturi.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC $FDC\ 443(497.4)+(438)(043.2)=163.6$
CX ash dieback/ash/*Fraxinus*/ *Hymenoscyphus pseudoalbidus*/Slovenia/Poland
CC
AU FLAJŠMAN, Katarina
AA JURC, Dušan (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 83
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of forestry and renewable forest resources
PY 2011
TI GROWTH CHARACTERISTICS OF *Chalara fraxinea* ISOLATES AND EFFECTS OF CULTURE MEDIA
DT Graduation Thesis (University studies)
NO X, 56 p., 4 tab., 29 fig., 2 ann., 24 ref.
LA sl
AL sl/en
AB

In this study, growth rate of the fungus *Chalara fraxinea* in pure culture was evaluated. 12 different isolates of the fungus (6 from Poland, 6 from Slovenia) were included to the assay. They were grown on 8 types of growth media (MEA, MEA with streptomycin sulphate, PDA, WA, Czapek agar, agar with beech, agar with flowering ash and agar with common ash extract) in 3 replicates. Colony diameters were measured regularly, within 8 weeks. Colony growth rate was calculated for each culture media and statistic analysis with one-way ANOVA and Kruskal-Wallis test was performed. Fungal isolations from 3–4 year old common ash (*Fraxinus excelsior*) trees, affected by ash dieback, were made. Results showed variability in growth rate between isolates and on different types of growth media, however, no clear regularities were indicated. Colony growth rate was higher on PDA and on growth media with wood extracts. The fungus growth on growth media with wood extract does not show actual tree species susceptibility to the disease since growth on beech extract medium was high. Growth rate of slovenian isolates was higher on most of the media, probably because of older isolates. The relatively low fungal growth rate on MEA was similar to that described in literature.

KAZALO

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PRILOG	X
1 UVOD.....	1
1.1 VZROK ZA RAZISKAVO	1
1.2 NAMEN RAZISKAVE	3
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 POJAV BOLEZNI IN NJENA RAZŠIRJENOST	4
2.1.1 Razširjenost v Evropi	4
2.1.2 Razširjenost v Sloveniji	5
2.2 GLIVA, POVZROČITELJICA JESENOVEGA OŽIGA	6
2.2.1 Odkritje nove vrste	6
2.2.2 Teleomorf glive <i>Chalara fraxinea</i>	7
2.2.3 Širjenje bolezni	8
2.2.4 Morfologija in vpliv temperature	9
3 MATERIALI IN METODE	11
3.1 GLIVNI IZOLATI.....	11
3.1.1 Podatki o izolatih.....	11
3.1.2 Priprava izolatov	12
3.2 GOJIŠČA.....	12
3.2.1 Sladni agar	13
3.2.2 Sladni agar s streptomycin sulfatom	14
3.2.3 Czapek agar	14
3.2.4 Krompirjev agar.....	15
3.2.5 Vodni agar	15
3.2.6 Agar z velikim jesenom, agar z malim jesenom in agar z bukvijo.....	15
3.3 METODE DELA	17

3.3.1	Obdelava podatkov	18
3.3.2	Izračun hitrosti rasti	18
3.3.3	Statistična analiza	20
3.4	IZOLACIJE	21
4	REZULTATI	24
4.1	VPLIV GOJIŠČ NA RAST	24
4.1.1	Potek rasti glive na različnih gojiščih.....	24
4.1.2	Hitrost rasti glive na različnih gojiščih.....	25
4.1.3	Potek rasti poljskih in slovenskih izolatov na različnih gojiščih.....	27
4.1.4	Hitrost rasti poljskih in slovenskih izolatov na različnih gojiščih.....	28
4.2	RAST POSAMEZNIH IZOLATOV GLIVE <i>Chalara fraxinea</i>	31
4.2.1	Sladni agar	33
4.2.2	Agar z bukvijo	34
4.2.3	Krompirjev agar.....	35
4.2.4	Agar z malim jesenom.....	36
4.2.5	Agar z velikim jesenom.....	37
4.2.6	Sladni agar s streptomycin sulfatom	38
4.2.7	Czapek agar	39
4.2.8	Vodni agar	41
4.3	REZULTATI IZOLACIJ.....	42
5.	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	45
5.1	RAZPRAVA.....	45
5.1.1	Vpliv gojišč na rast.....	45
5.1.2	Razlike v rasti med izolati na sladnem agarju	47
5.1.3	Razlike v rasti med izolati na različnih gojiščih.....	49
5.2	SKLEPI.....	50
6	POVZETEK	52
7	VIRI.....	54
	ZAHVALA.....	57
	PRILOGE	58

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Podatki o izolatih.....	11
Preglednica 2: Šifrant imen gojišč.....	13
Preglednica 3: Hitrost rasti glive na posameznih gojiščih in standardni odklon.....	25
Preglednica 4: Hitrost rasti poljskih in slovenskih izolatov glive na posameznih gojiščih in standardni odklon	29

KAZALO SLIK

Slika 1: Simptomi bolezni na velikem jesenu (<i>Fraxinus excelsior</i>) (Foto: Gal Fidej).....	2
Slika 2: Zemljevid Evrope, ki kaže razširjenost velikega jesena (<i>Fraxinus excelsior</i>) (EUFORGEN, 2009), in leto v katerem so v določenih državah prvič opazili simptome jesenovega ožiga (Timmermann in sod., 2009).....	4
Slika 3: Apotecija neprave pecljevke (<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>) na jesenovem listnem peclju (Foto: Tine Hauptman).....	8
Slika 4: Priprava bukovega agarja na Rotamix magnetnem mešalniku (Rotamix 550 mvh) (Foto: Katarina Flajšman).....	16
Slika 5: Primer petrijevke z glivno kolonijo, ki smo ji merili premer v dveh pravokotnih smereh (Foto: Katarina Flajšman)	18
Slika 6: Izračun hitrosti rasti.....	19
Slika 7: Okuženo mladje velikega jesena (<i>Fraxinus excelsior</i>) v okolici Kamnika (Foto: Gal Fidej).....	21
Slika 8: Simptomi okužbe z glivo <i>Chalara fraxinea</i> – nekroza na poganjku velikega jesena (<i>Fraxinus excelsior</i>) (Foto: Gal Fidej).....	22
Slika 9: Potek rasti glive na različnih gojiščih	24
Slika 10: Hitrost rasti glive na posameznih gojiščih. Prikazane so povprečne hitrosti in $\pm$ standardna napaka.....	26
Slika 11: Prikaz poteka rasti poljskih izolatov na različnih gojiščih.....	27
Slika 12: Prikaz poteka rasti slovenskih izolatov na različnih gojiščih.....	28
Slika 13: Primerjava hitrosti rasti poljskih in slovenskih izolatov glive na posameznih gojiščih. Prikazane so povprečne hitrosti in $\pm$ standardna napaka.	30
Slika 14: Potek rasti izolatov na sladnem agarju	31
Slika 15: Povprečni premer kolonij različnih izolatov glive <i>Chalara fraxinea</i> po 21 dneh rasti na sladnem agarju pri temperaturi 22 °C in v temi.....	32
Slika 16: Hitrost rasti izolatov na sladnem agarju. Prikazane so povprečne hitrosti in $\pm$ standardna napaka.....	33
Slika 17: Hitrost rasti izolatov na agarju z bukvijo. Prikazane so povprečne hitrosti in $\pm$ standardna napaka.....	34
Slika 18: Hitrost rasti izolatov na krompirjevem agarju. Prikazane so povprečne hitrosti in $\pm$ standardna napaka	35
Slika 19: Hitrost rasti izolatov na agarju z malim jesenom. Prikazane so povprečne hitrosti in $\pm$ standardna napaka	36
Slika 20: Hitrost rasti izolatov na agarju z velikim jesenom. Prikazane so povprečne hitrosti in $\pm$ standardna napaka.....	37

Slika 21: Hitrost rasti izolatov na sladnem agarju s streptomycin sulfatom. Prikazane so povprečne hitrosti in $\pm$ standardna napaka	38
Slika 22: Hitrost rasti izolatov na Czapek agarju. Prikazane so povprečne hitrosti in $\pm$ standardna napaka.....	39
Slika 23: Značilna oblika hif glive <i>Chalara fraxinea</i> , izolata KRW, na Czapek agarju (Foto: Katarina Flajšman).....	40
Slika 24: Hitrost rasti izolatov na vodnem agarju. Prikazane so povprečne hitrosti in $\pm$ standardna napaka.....	41
Slika 25: Izolirana glivna kolonija na sladnem agarju pod lupo Olympus SZX 12 (Foto: Tine Hauptman)	42
Slika 26: Trosišča na sladnem agarju pod lupo Olympus SZX 12 (Foto: Tine Hauptman)	43
Slika 27: a. Prvi nastali veliki konidij; b. kasneje nastali mali konidiji (Foto: Tine Hauptman)	43
Slika 28: Konidiji v obliki sluzastih kapljic (Foto: Tine Hauptman)	44
Slika 29: Fialide na hifah (Foto: Tine Hauptman).....	44

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Hitrost rasti glivnih kolonij 12 različnih izolatov glive <i>Chalara fraxinea</i> na 8 različnih gojiščih (mm/dan) in standardni odklon	58
PRILOGA B: Rezultati Kruskal-Wallisovega testa pri primerjavi hitrosti rasti posameznih izolatov glive <i>C. fraxinea</i> na različnih gojiščih. Ničelna hipoteza je, da ni statistično značilnih razlik med hitrostjo rasti izolatov pri stopnji značilnosti $\alpha = 0,05$	59

1 UVOD

1.1 VZROK ZA RAZISKAVO

Jesenov ožig, ki ga povzroča gliva *Chalara fraxinea*, je bolezen, ki resno ogroža jesene, predvsem veliki in ozkolistni jesen na območju Evrope. EPPO, medvladna organizacija, ki je odgovorna za evropsko sodelovanje na področju varstva rastlin v Evropi in v Mediteranu, je uvrstila glivo *Chalara fraxinea* na EPPO alarmni seznam (EPPO alert list). Namen EPPO alarmnega seznama je, da obvešča države članice EPPO o škodljivih organizmih, ki predstavljajo potencialno nevarnost. Gliva *C. fraxinea* je na seznamu od leta 2007 (EPPO, 2011).

Rod jesenov (*Fraxinus*) spada v družino oljkovk (Oleaceae), v red oljkovcev (Oleales). V Sloveniji so avtohtone tri vrste jesena. Veliki jesen (*Fraxinus excelsior* L.), mali jesen (*Fraxinus ornus* L.) in poljski ali ostroplodni jesen (*Fraxinus angustifolia* Vahl). Predvsem veliki jesen je gospodarsko pomembna vrsta, čeprav količina njegovega lesa ni velika. Spada med plemenite listavce. Je značilna evropska vrsta in je naravno razširjen skoraj po vsej Evropi (Brus, 2004). Prav tako je bolezen jesenov ožig, ki jo povzroča gliva *C. fraxinea*, razširjena po večini evropskih držav, kjer je prisoten jesen.

Ogrožena sta predvsem veliki jesen (*Fraxinus excelsior*) in poljski jesen (*F. angustifolia*), ki ju bolezen močno prizadene. Mali jesen (*F. ornus*) pa je po prvih opažanjih zelo odporen na bolezen in v naravnih sestojih ni prizadet (Kirisits in sod., 2009a). Ogroženi so jeseni vseh starosti. Mortaliteta je velika predvsem med drevesi mlajših razvojnih faz, onemogočena je tudi pridelava zdravih sadik v drevesnicah (Hauptman in sod., 2010).

Najbolj pogost simptom jesenovega ožiga je venenje listov in sušenje poganjkov (slika 1). Odraslim drevesom odmirajo veje. Na okuženih poganjkih je mogoče opaziti tudi vzdolžne rjavkaste nekroze in rake, ki jih povzroči gliva *C. fraxinea* (Ogris, 2008).



Slika 1: Simptomi bolezni na velikem jesenu (*Fraxinus excelsior*) (Foto: Gal Fidej)

Z raziskavami glive so leta 2008 ugotovili, da je gliva *Chalara fraxinea* anamorf že dolgo znane vrste glive *Hymenoscyphus albidus*, ki ni patogena in je razširjena po celotni Evropi. Kasneje se je izkazalo, da je gliva *Hymenoscyphus albidus* pravzaprav kriptična vrsta, zato so opisali novo vrsto z imenom *Hymenoscyphus pseudoalbidus* V. Queloz, C. R. Grünig, R. Brndt, T. Kowalski, T. N. Sieber & O. Holdenrieder (Queloz in sod., 2010).

Razvojni krog glive *H. pseudoalbidus* se ne razlikuje od razvojnega kroga *H. albidus*. Potem ko gliva prezimi v okuženem odpadlem listju, v začetku poletja oblikuje trosišča na delno razkrojenih listnih pecljih. Trosišča so apoteciji belkaste barve. V apotecijih nastajajo aski z askosporami, ki jih razširja veter. Veter askospore raznese na zdravo jesenovo listje, kjer vzkalijo, listje okužijo in tvorijo micelij, ki se razraste v notranjost lista. Gliva se nato verjetno skozi pecelj razraste do poganjka in se razrašča v njem. Ko listje jeseni odpade in obleži na tleh, se razvojni krog glive ponovno začne (Queloz in sod., 2010).

Pojav nove bolezni, ki jo je povzročila vrsta *Hymenoscyphus pseudoalbidus* (anamorf *Chalara fraxinea*), je težko pojasniti. Potrebna so nadaljnja raziskovanja za boljše in popolnejše razumevanje taksonomije in biologije te patogene glive.

1.2 NAMEN RAZISKAVE

O ekoloških in fizioloških značilnostih glive *Chalara fraxinea* še vedno ni znanega veliko. Z gojenjem glivnih kolonij na laboratorijsko pripravljenih gojiščih lahko opazujemo njihovo rast, barvo, strukturo micelija ter odziv glive na sestavo gojišča. S tovrstnimi raziskavami lahko pridemo do zaključkov, ki nam utegnejo koristiti tudi v praksi. Kowalski navaja (Kowalski, 2006), da je velikost premera glivnih kolonij na sladnem agarju po treh tednih (21 dni) rasti pri temperaturi 20 °C in v temi znašala od 9 mm do 28 mm, po 30 dneh pa od 18 mm do 45 mm. Sicer se v literaturi večkrat omenja, da je rast kolonij glive *C. fraxinea* relativno počasna. (Kowalski in Holdenrieder, 2009a; Kowalski in Bartnik, 2010). Omenjene ugotovitve se nanašajo na gojenje glive na sladnem agarju. Kowalski in Bartnik (2010) ugotavljata tudi, da so med posameznimi izolati statistično značilne razlike v hitrosti rasti. Namen naloge je bil ugotoviti razlike v rasti glivnih kolonij različnih izolatov glive *C. fraxinea*, primerjati izsledke z že znanimi podatki iz literature in opazovati rast glive *C. fraxinea* na 8 različnih gojiščih. V poskus smo poleg slovenskih, vključili tudi poljske izolate, katere nam je poslal prof. T. Kowalski, ki je glivo *C. fraxinea* tudi prvi opisal.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

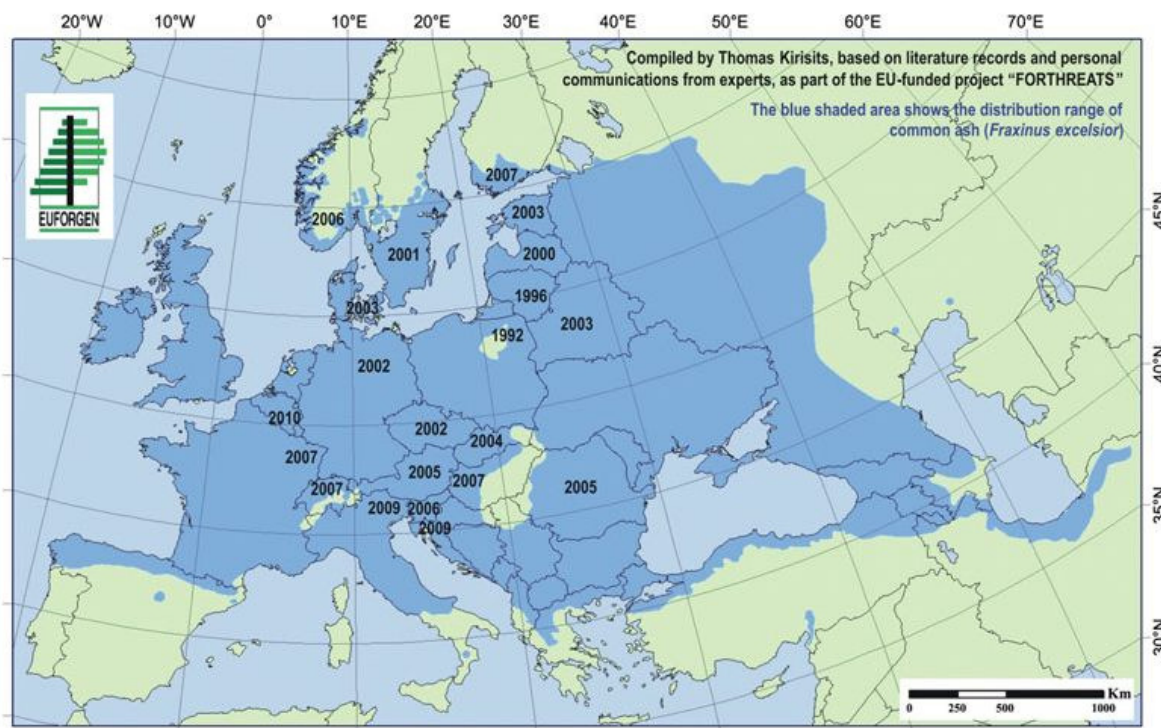
Prva hipoteza je bila povezana z vplivom lastnosti gojišča na rast glive. Predpostavili smo, da na rast glive *Chalara fraxinea* vpliva sestava gojišč.

Z drugo hipotezo smo predvidevali, da so razlike v rasti med posameznimi izolati glive *Chalara fraxinea* statistično značilne.

2 PREGLED OBJAV

2.1 POJAV BOLEZNI IN NJENA RAZŠIRJENOST

Odmiranje jesenov so prvič opazili in zabeležili v začetku 90. let v Litvi in na Poljskem. Do novembra 2010 so bolezen zabeležili že v 22 evropskih državah (Timmermann in sod., 2011). Na sliki 2 je prikazan zemljevid Evrope, ki kaže razširjenost velikega jesena (*Fraxinus excelsior*) (EUFORGEN, 2009), in leto, v katerem so v določenih državah prvič opazili simptome jesenovega ožiga (Timmermann in sod., 2009).



Slika 2: Zemljevid Evrope, ki kaže razširjenost velikega jesena (*Fraxinus excelsior*) (EUFORGEN, 2009), in leto, v katerem so v določenih državah prvič opazili simptome jesenovega ožiga (Timmermann in sod., 2009)

2.1.1 Razširjenost v Evropi

Na Poljskem opažajo intenzivno odmiranje velikega jesena (*Fraxinus excelsior*) že zadnjih 15 let. Na začetku je bilo odmiranje prisotno le v severozahodnem delu države, kasneje pa se je pojav razširil čez celo državo (Kowalski, 2006). Tudi na Češkem opazujejo

propadanje jesena na več lokacijah že od konca 90. let prejšnjega stoletja (Jankovsky in Holdenrieder, 2009). V istem času se je odmiranje pojavilo tudi v Latviji. V Litvi je od začetka 90. let in do zdaj odmrlo več kot 60 % jesenovih sestojev. V nekaterih delih države sta ostala le še 2 % navidez zdravih dreves velikega jesena (Bakys in sod., 2009).

V Avstriji so odmiranje velikega jesena opazili med letoma 2003 in 2005, od leta 2006 pa je stanje kritično, saj je bolezen razširjena po več delih države (Kirisits in sod., 2008). Podobno so tudi na Danskem opazili odmiranje velikega jesena med letoma 2003 in 2004, ki se je nato med 2005 in 2007 še bolj razširilo (Bakys in sod., 2009). V Nemčiji in na Švedskem so lokalno opazili pojav leta 2002. Na Švedskem so o večji razširjenosti bolezni po vsem območju, kjer je prisoten veliki jesen, poročali leta 2004. Širjenje bolezni je tukaj potekalo od jugo-vzhoda in juga proti zahodnim in centralnim delom države (Bakys in sod., 2009).

O pojavu glive *Chalara fraxinea* so poročali še iz Švice, Italije, Francije, Belgije, Estonije, Madžarske, Slovaške, Romunije, Belorusije, Rusije, Norveške, Finske, Hrvaške in Slovenije. (Timmermann in sod., 2011).

2.1.2 Razširjenost v Sloveniji

Jesenov ožig so najprej ugotovili v severovzhodnem in severnem predelu Slovenije, leta 2006. V letu 2008 so ga opazili že po vsej državi. Intenziteta pojava se razlikuje od predela do predela. Leta 2008 je Gozdarski inštitut Slovenije odvzel vzorce s 23 lokacij z 11 gozdnogospodarskih območij. Na večini lokacij je bila prisotnost glive *C. fraxinea* potrjena z izolacijo v čisto kulturo (Ogris, 2008).

2.2 GLIVA, POVZROČITELJICA JESENOVEGA OŽIGA

2.2.1 Odkritje nove vrste

Gliva *Chalara fraxinea* je bila opisana šele leta 2006, opisal pa jo je T. Kowalski (Kowalski, 2006). Gliva spada v anamorfni rod *Chalara*. Izolirali so jo iz poganjkov in vej ter celo iz korenin odmirajočih jesenov (*Fraxinus excelsior*). Od predhodno opisanih vrst iz rodu *Chalara* se razlikuje po majhnih, kratkih fialokonidijih cilindrične oblike. Konidiji se pojavljajo v verigah ali pa v sluzastih kapljicah. Prvi nastali konidiji se morfološko razlikujejo od ostalih in so večji od kasneje nastalih konidijev.

Takrat so postavili tri hipoteze o vzrokih za pojav jesenovega ožiga in naglo propadanje jesenov. Po prvi naj bi bilo propadanje posledica sprememb v okolju, predvsem vremenskih ekstremov. Glive, ki so prisotne v propadajočih tkivih, so slabo patogene. Druga hipoteza govori o glivi *C. fraxinea* kot o avtohtoni glivi, ki v običajnih razmerah ni škodljiva. Zaradi podnebnih sprememb in morda v sodelovanju z drugimi glivami pa naj bi postala povzročiteljica propadanja jesenov. Po tretji hipotezi je gliva *C. fraxinea* obravnavana kot tujerodna, invazivna vrsta glive, ki je bila od neznano kod prinesena v Evropo in je močno patogena (Jurc, 2009). Danes velja, da je najverjetnejša tretja hipoteza, da je torej gliva *C. fraxinea* tujerodna, invazivna gliva, ki je bila vnesena v Evropo od drugod (Kirisits in Cech, 2011).

Bakys in sod. (2009) so preučevali, katere glive so prisotne v odmirajočih krošnjah velikega jesena in kakšna je njihova vloga pri odmiranju jesenov. Poganjke iz odmirajočih krošenj so nabrali na štirih različnih lokacijah v centralnem delu Švedske in jih razdelili v štiri kategorije glede na intenziteto simptomov (nekroz), od navidezno zdravih do takih z odmrliimi vrhovi. Iz vseh poganjkov skupaj so izolirali glive iz 48 različnih rodov. Z glivami, ki so se pojavljale najpogosteje, so naredili test patogenosti, ki je pokazal, da je med vsemi prisotnimi najbolj patogena gliva ravno *C. fraxinea*.

2.2.2 Teleomorf glive *Chalara fraxinea*

Leta 2009 so objavili prve izsledke o teleomorfu glive *Chalara fraxinea*. (Kowalski in Holdenrieder, 2009b). Teleomorf naj bi bil gliva *Hymenoscyphus albidus*, katere slovensko ime je belkasta pecljevka (Jurc, 2009). Ta gliva je v Evropi splošno razširjena, najdemo pa jo na trohnečih listnih pecljih jesenov. Najdena ni bila na nobenem drugem gostitelju, razen na jesenu (Kowalski in Holdenrieder, 2009b). Opravili so molekularne analize, ki so pokazale, da ima gliva *C. fraxinea* enako nukleotidno zaporedje v delu genoma (ITS regija) kot gliva *Hymenoscyphus albidus*. Te prve ugotovitve so pokazale, da jesenov ožig povzroča vrsta glive, ki oblikuje dve vrsti trosov: nespolne konidije, ki jih oblikuje anamorf z imenom *C. fraxinea* in spolne askospore, ki jih oblikuje teleomorf z imenom *H. albidus* (Kowalski in Holdenrieder, 2009b).

Večinoma imajo anamorfi iz rodu *Chalara* teleomorfe uvrščene v rod *Ceratocystis*, vse te glive pa imajo trosišča v obliki peritecijev. Gliva *C. fraxinea* je tukaj izjema, saj ima teleomorf v obliki apotecijev (Jurc, 2009).

Gliva *H. albidus* je v Evropi naravno razširjena in znana že od njenega opisa leta 1851, zato si je bilo nenaden pojav bolezni, ki naj bi jo povzročala prav ta gliva, težko razlagati. Norveški raziskovalci so primerjali apotecije nabrane na okuženih območjih, z apoteciji nabranimi v popolnoma zdravih jesenovih sestojih. Rezultati so pokazali, da obstajajo razlike med glivama na molekularni ravni (Hauptman in sod., 2010, cit. po Solheim, 2009).

Kasneje so Queloz in sod. (2010) ugotovili, da morfološko identični izolati vrste *H. albidus* ne predstavljajo le ene vrste glive, temveč se razvrstijo v dve skupini, ki nista posledica hibridizacije. Gliva *H. albidus* je kriptična vrsta, v kateri sta bili skriti dve morfološko enaki a genetsko različni vrsti gliv, in sicer že opisana vrsta *H. albidus*, ter nova vrsta *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. Raziskave z molekularnimi tehnikami so pokazale, da povzroča jesenov ožig tudi v Sloveniji gliva *H. pseudoalbidus*, predlagano slovensko ime za glivo pa je neprava pecljevka (Piškur, 2010). Na sliki 3 so prikazani apoteciji neprave pecljeveke (*H. pseudoalbidus*) na listnem peclju jesena.



Slika 3: Apotecija neprave pecljevke (*Hymenoscyphus pseudoalbidus*) na jesenovem listnem peclju (Foto: Tine Hauptman)

2.2.3 Širjenje bolezni

Preden so odkrili glivo *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, teleomorf glive *Chalara fraxinea*, še ni bilo jasno, kako je izjemno hitro širjenje glive po Evropi sploh mogoče. Sedaj je najverjetneje, da igrajo glavno vlogo v življenjskem krogu patogena apoteciji in askspore, ki jih veter lahko prenaša na velike razdalje. Konidiji anamorfa so namreč sluzasti in jih veter na more prenašati (Timmerman in sod., 2011).

Apoteciji glive *H. pseudoalbidus* se pojavijo na lanskoletnih trohnečih listnih pecljih jesenov. Lahko se razvijejo tudi na odmrlih poganjkih 1–3-letnih sejank v drevesnicah, ali pa na odlomljenih poganjkih in vejah, ki ležijo v stiku s tlemi. Apoteciji imajo diskasto trosovnico premera 1,5–3 mm, bet je 0,4–2,0 mm visok. Najprej so beli, nato smetanasti in v starosti cimetasto rjavi. Bet je spodaj temnejši, včasih črn. Na mestu, kjer gliva poganja iz podlage, je običajno oblikovana črna psevdosklerocijska plošča (Jurc, 2009).

Širjenje patogena in dnevne vzorce izmetavanja askospor v zrak so raziskovali Timmermann in sod. (2011) na Norveškem. V raziskavah so ugotovili, da je koncentracija

askospor *H. pseudoalbidus* najvišja od poznega julija do sredine avgusta. Dnevno izmetavanje askospor iz apotecijev pa je bilo največje predvsem med 6. in 8. uro zjutraj.

Kljub nekaterim ugotovitvam še zdaj ni popolnoma jasno, kako pravzaprav poteka okužba z glivo, kdaj v letu in pod kakšnimi pogoji.

Kräutler in Kirisits (2011) sta ugotovila, da so okužbe listja pomemben del v razvojnem krogu glive in da je za simptome uvelega listja na jesenu najpomembnejši teleomorf glive *C. fraxinea* – *H. pseudoalbidus*. V poskusu inokulacije glive *H. pseudoalbidus* na površino listov z askosporami sta preučevala odziv treh vrst jesenov (*Fraxinus excelsior*, *F. angustifolia*, *F. ornus*). Ugotovila sta, da je patogen povzročil simptome bolezni (nekroze na listnih pecljih, venenje, odpadanje listja) na listih vseh treh vrst jesenov, ki pa so se pojavljali v značilnih vzorcih za vsako vrsto. Iz rezultatov sklepata, da utegnejo biti listi najpomembnejša pot do okužbe poganjkov jesenov.

2.2.4 Morfologija in vpliv temperature

Kowalski in Bartnik (2010) sta raziskovala vpliv temperature na rast glive *Chalara fraxinea* in kakšne so možne morfološke različice različnih izolatov glive. Pri raziskovanju vpliva temperature so uporabili 30 naključno izbranih kultur glive *C. fraxinea*, ki so bile izolirane iz jesenovih poganjkov s simptomi odmiranja. V raziskavo so vključili obolela drevesa velikega jesena (*Fraxinus excelsior*) iz različnih lokacij. Kolonije so rasle 5 tednov v rastnih komorah, v temi in pri temperaturah 5, 10, 15, 20, 25 in 30 °C. Temperatura je eden izmed glavnih dejavnikov, ki vpliva na morfologijo kolonij. Barva kolonij je bila odvisna tudi od intenzitete sporulacije konidijev, ki je bila praviloma pogojena z nižjimi temperaturami. Morfologijo kolonij so vrednotili glede na barvo, strukturo, hitrost rasti in prisotnost diskoloriranih delov, ter na podlagi tega določili tri barvne tipe kolonij: A – prozorne, enakomerno bele ali bele s sivimi progami ali sektorji; B – belo-oranžne ali bele z rjasto rjavimi progami; C – rjasto rjave. Hkrati so tudi ugotovili, da je ena izmed značilnosti kolonij glive *C. fraxinea* tudi tendenca k tvorbi sektorjev, ki se razlikujejo po barvi, strukturi micelija in hitrosti rasti.

Hitrost rasti kolonij glive *C. fraxinea* je bila relativno počasna, določena pa je bila na podlagi premera kolonije (mm).

Glede na kardinalne temperaturne točke (minimum, optimum in maksimum) lahko klasificiramo glive v hladnoljubne (psihrofile), mezofile in termofile. V raziskavi so ugotovili da bi glivo *C. fraxinea*, glede na njene odzive na temperaturo lahko uvrstili med mezofile (minimum > 0 °C, maksimum < 50 °C, optimum = 15–40 °C). Optimalna temperatura za rast večine izolatov je bila 20 °C.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 GLIVNI IZOLATI

V poskus so bili vključeni izolati glive *Chalara fraxinea* iz dvanajstih različnih lokacij. 6 iz Slovenije (NEGL, RIBW, KRW, MUTW, SBW, KAM) in 6 iz Poljske (P4482, P4035, P4253, P4007, P4252, P4478). Podatki o lokacijah izolatov, šifra izolata, datumi izolacij in osebe, ki so opravile izolacijo, so navedeni v preglednici 1.

3.1.1 Podatki o izolatih

Preglednica 1: Podatki o izolatih

Šifra izolata	Država izvora	Podatki o lokaciji	Datum izolacije	Glivo izoliral
NEGL	Slo	Negova (x: 572000, y: 163000)	6. 4. 2007	Nikica Ogris
RIBW	Slo	Ribnica (x: 482409, y: 61127)	26. 7. 2007	Nikica Ogris
KRW	Slo	Kranj (x: 450860, y: 122100)	1. 8. 2008	Nikica Ogris
MUTW	Slo	Muta (x: 163310, y: 512495)	24. 9. 2010	Tine Hauptman
KAM	Slo	Kamnik (x: 119470, y: 471433)	4. 11. 2010	Tine Hauptman
SBW	Slo	Sabansko bukovje (x: 503596; y: 95472)	1. 6. 2007	Nikica Ogris
P4035	Pl	Gozdno okrožje Rokita/v bližini Szczecina	16. 8. 2010	Tadeusz Kowalski
P4482	Pl	Gozdno okrožje Mircze/v bližini Lublina	22. 9. 2010	Tadeusz Kowalski
P4252	Pl	Gozdno okrožje Stary Sącz/v bližini Krakova	5. 8. 2010	Tadeusz Kowalski
P4478	Pl	Gozdno okrožje Mircze/v bližini Lublina	22. 9. 2010	Tadeusz Kowalski
P4007	Pl	Gozdno okrožje Rokita/v bližini Szczecina	16. 8. 2010	Tadeusz Kowalski
P4253	Pl	Gozdno okrožje Stary Sącz/v bližini Krakova	5. 8. 2010	Tadeusz Kowalski

3.1.2 Priprava izolatov

Izolati so bili do začetka poskusa shranjeni v hladilniku pri 4 °C in v temi. Za poskus smo potrebovali zadostno število vcepkov vsakega izolata. (za 8 gojišč in 3 ponovitve, torej 24 vcepkov za posamezen izolat). Slovenske izolate smo precepili 10. 12. 2010, poljske pa 14. 12. 2010. Precepili smo jih na 2 % sladni agar (MEA; 20 g l⁻¹ malt extract Bacto, 15 g l⁻¹ agar Technical Difco) in jih v inkubatorju gojili 4 tedne pri temperaturi 22 °C in v temi.

3.2 GOJIŠČA

Laboratorijske raziskave gliv so pomembno dopolnilo k njihovim opazovanjem na terenu. Izolacija in gojenje gliv v čisti kulturi zahtevata pripravo sterilnega rastnega medija (gojišča). Večina gojišč vsebuje vsaj vodo, enostaven ali kompleksen vir ogljika (ogljikove hidrate, lipide, peptide, aminokisline, organske kisline) in dušika (peptidi, aminoisline, amonijak, nitrati), fosfate, žveplo, esencialne kovinske katione in včasih vitamine in esencialne aminokisline. Za strditev medija se uporablja agar (Mueller in sod., 2004).

Na rast gliv in njihov razvoj močno vplivajo sestava medija, laboratorijski pogoji in fizično okolje (svetloba, temperatura). Z gojenjem različnih izolatov na različnih gojiščih smo opazovali, kako na njeno rast vpliva sestava medija. Za potrebe poskusa smo pripravili 8 različnih vrst gojišč (sladni agar, sladi agar z dodanim streptomycin sulfatom, Czapek agar, krompirjev agar, vodni agar, agar z velikim jesenom, agar z malim jesenom, agar z bukvijo). Pri prikazu rezultatov smo za ime gojišča uporabljali šifre oziroma kratice, ki so predstavljene v preglednici 2.

Preglednica 2: Šifrant imen gojišč

Gojišče	Šifra gojišča
Sladni agar	MEA
Agar z bukvi	BUKEV
Krompirjev agar	PDA
Agar z malim jesenom	M.JESEN
Agar z velikim jesenom	V.JESEN
Sladni agar s streptomycin sulfatom	MEA+ss
Czapkov agar	CZAPEK
Vodni agar	VODNI

Za pripravo vsakega od gojišč so potrebne točno določene sestavine in postopek dela, ki so opisani v nadaljevanju. Vsakega od medijev smo sterilizirali v avtoklavu 20 min pri temperaturi 120–121 °C in tlaku 2,5 bara. Steriliziran topel medij (45–50 °C) smo razdelili v sterilne petrijevke. Pozorni smo bili na to, da smo v vsako petrijevko odmerili enako količino medija. Z medijem smo zapolnili približno polovico višine petrijevke.

3.2.1 Sladni agar

slad (malt extract Bacto)	20 g
agar (Technical Difco)	15 g
destilirana voda	1 l

Pripravili smo 2 % sladni agar. V 1 l destilirane vode smo zamešali 20 g sladnega izvlečka (malt extract Bacto) in 15 g agarja (agar Technical Difco). Mešali smo na magnetnem mešalniku (Rotamix) pri temperaturni stopnji 9 in hitrosti mešanja 400 ter segrevali do vretja (5–10 minut). Erlenmajerico smo pred tem pokrili z alu-folijo, da med segrevanjem vsebina ni izhlapevala. Pripravljeno mešanico smo nato sterilizirali v avtoklavu (20 min, 120–121 °C, 2,5 bara).

3.2.2 Sladni agar s streptomycin sulfatom

slad (malt extract Bacto)	20 g
agar (Technical Difco)	15 g
destilirana voda	1 l
streptomycin sulfat (Calbiochem)	100 mg

2 % sladni agar s streptomycin sulfatom smo pripravili po enakem postopku kot sladni agar brez streptomycin sulfata. Streptomycin sulfat smo dodali šele po sterilizaciji z avtoklavom, pred tem pa smo agar še ohladili na primerno temperaturo (manj kot 40 °C).

3.2.3 Czapek agar

saharoza (Merck)	30,0 g
NaNO ₃ (Carlo Erba Reagenti)	3,0 g
K ₂ HPO ₄ (Merck)	1,0 g
MgSO ₄ + 7H ₂ O (Carlo Erba Reagenti)	0,05 g
KCl (Carlo Erba Reagenti)	0,5 g
FeSO ₄ + 7H ₂ O (Carlo Erba Reagenti)	10,0 mg
agar (agar Technical Difco)	20,0 g
vodovodna voda	1 l

Vse sestavine smo odmerili in zamešali v 1 l destilirane vode. Mešali smo na magnetnem mešalniku (Rotamix) pri temperaturni stopnji 9 in hitrosti mešanja 400 ter segrevali do vretja (5–10 minut). Pripravljeno mešanico smo nato sterilizirali v avtoklavu (20 min, 120–121 °C, 2,5 bara).

3.2.4 Krompirjev agar

krompirjev glukozni agar(Difco™)	39 g l ⁻¹
destilirana voda	1 l

V 1 l destilirane vode smo zamešali 39 g pripravka za krompirjev agar (potato dextrose agar Difco™). Mešali smo na magnetnem mešalniku (Rotamix) pri temperaturni stopnji 9 in hitrosti mešanja 400 ter segrevali do vretja (5–10 minut). Posodo smo pred tem pokrili z alu-folijo, da med segrevanjem vsebina ne bi izhlapela. Pripravljeno mešanico smo nato sterilizirali v avtoklavu (20 min, 120–121 °C, 2,5 bara).

3.2.5 Vodni agar

agar (Technical Difco)	15 g
destilirana voda	1 l

V 1 l destilirane vode smo zamešali samo 15 g agarja (Technical Difco). Mešali smo na magnetnem mešalniku (Rotamix) pri temperaturni stopnji 9 in hitrosti mešanja 400 ter segrevali do vretja (5–10 minut). Pripravljeno mešanico smo nato sterilizirali v avtoklavu (20 min, 120–121 °C, 2,5 bara).

3.2.6 Agar z velikim jesenom, agar z malim jesenom in agar z bukvijo

žaganje lesa skupaj s skorjo	100 g
destilirana voda	1 l

Agar z bukvijo, z velikim jesenom in z malim jesenom smo pripravili po enakem postopku. Osnova za pripravo teh gojišč so bili izvlečki iz lesa in skorje izbranih drevesnih vrst. Najprej smo nabrali 2–4 cm debele veje vsake drevesne vrste. Bukev in veliki jesen smo nabrali v okolici Velenja (Gaberke), mali jesen pa v okolici Cerknice (pobočje Slivnice). S

pomočjo žagice za obrezovanje drevja smo iz vsake drevesne vrste posebej pridobili 100 g svežega žaganja lesa skupaj s skorjo.

K 100 g žaganja smo dodali 1 l destilirane vode in nato na Rotamix magnetnem mešalniku (Rotamix 550 mvh) ob neprestanem mešanju zmes segrevali do vretja. Ko je mešanica zavrela, smo jo kuhali eno uro pri 5. stopnji temperature. Hitrost mešanja je bila 400. Če je prišlo do razslojevanja mešanice, smo hitrost povečali na 600 in kasneje zopet zmanjšali na 500 (slika 4).



Slika 4: Priprava bukovega agarja na Rotamix magnetnem mešalniku (Rotamix 550 mvh) (Foto: Katarina Flajšman)

Po kuhanju smo mešanico ohladili in prefiltrirali skozi filtrirni papir s pomočjo vakuumske črpalke. Na ta način smo odstranili vse trde delce. V kolikor je bila količina prefiltriranega ekstrakta manjša od enega litra (izgube pri filtriranju, izparevanje), smo ji dodali še ustrezno količino destilirane vode.

V 1 l ekstrahirane tekočine smo dodali agar (15 g l^{-1} Technical Difco) in na magnetnem mešalniku segreli do vretja, da se je agar popolnoma raztopil. Raztopino smo nato 20 min sterilizirali v avtoklavu pri temperaturi $120\text{--}121^\circ\text{C}$ in pritisku 2,5 bara.

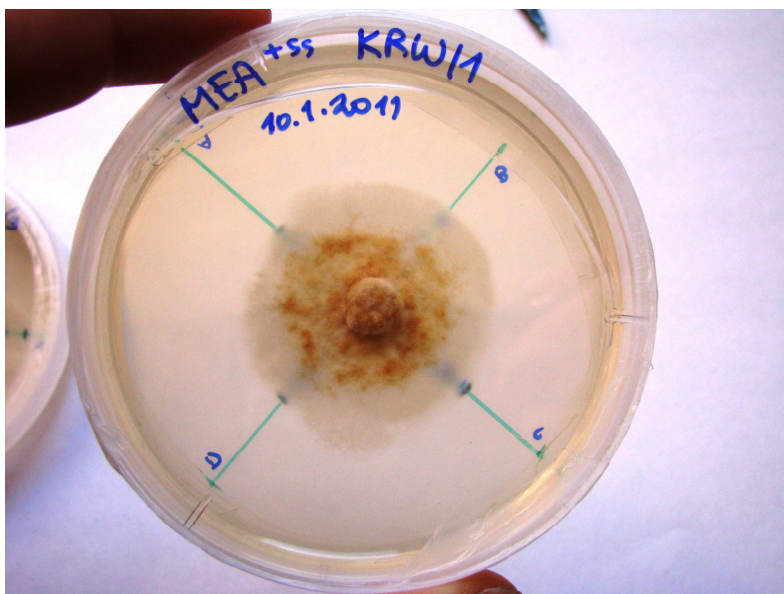
V mikrobiološki zaščitni komori (laminarij) smo z gojišči napolnili petrijevke.

3.3 METODE DELA

Precepljanje vseh dvanajstih izolatov na pripravljena gojišča je potekalo dva dni, in sicer 10. 1. 2011 in 11. 1. 2011. Prvi dan smo izolate precepili na sladni agar, na sladni agar s streptomycin sulfatom, na krompirjev agar ter na agar z bukvijo, agar z malim jesenom in na agar z velikim jesenom. Naslednji dan smo jih precepili še na vodni in na Czapek agar.

V roku treh dni (14. 1. 2011), ko so se vcepki že prijeli na gojišče, smo na hrbtno stran petrijevk narisali pravokoten križ. Ta nam je bil v pomoč pri opravljanju meritev premera v dveh straneh (slika 5).

Rast izolatov smo spremljali 8 tednov (od 10. 1. 2011 do 21. 3. 2011). Meritve smo izvajali trikrat tedensko, navadno ob ponedeljkih, sredah in petkih, in sicer v zgodnjih jutranjih in dopoldanskih urah. Podatke smo vpisovali v program Excel. Hitrost rasti smo ocenjevali na podlagi meritev premera. Premer smo merili v dveh pravokotnih smereh. Vsakemu izmerjenemu premeru je bilo treba odšteti še premer vcepka, ki je znašal 6 mm. Povprečen premer glive v petrijevki smo dobili z izračunom aritmetične sredine premerov v obeh smereh.



Slika 5: Primer petrijevke z glivno kolonijo, ki smo ji merili premer v dveh pravokotnih smereh (Foto: Katarina Flajšman)

3.3.1 Obdelava podatkov

S pomočjo dobljenih premerov glivnih kolonij v vsaki petrijevki smo na grafih izrisali potek rasti gliv v celotnem obdobju merjenja (8 tednov). Izdelali smo grafe, ki prikazujejo rast vseh treh ponovitev za posamezni izolat na vsakem gojišču posebej.

Pri izdelavi grafov, ki prikazujejo potek rasti glive na določenem gojišču, smo uporabili vse izmerjene podatke in izračunali aritmetično sredino vseh izmerjenih premerov glive na posameznem gojišču.

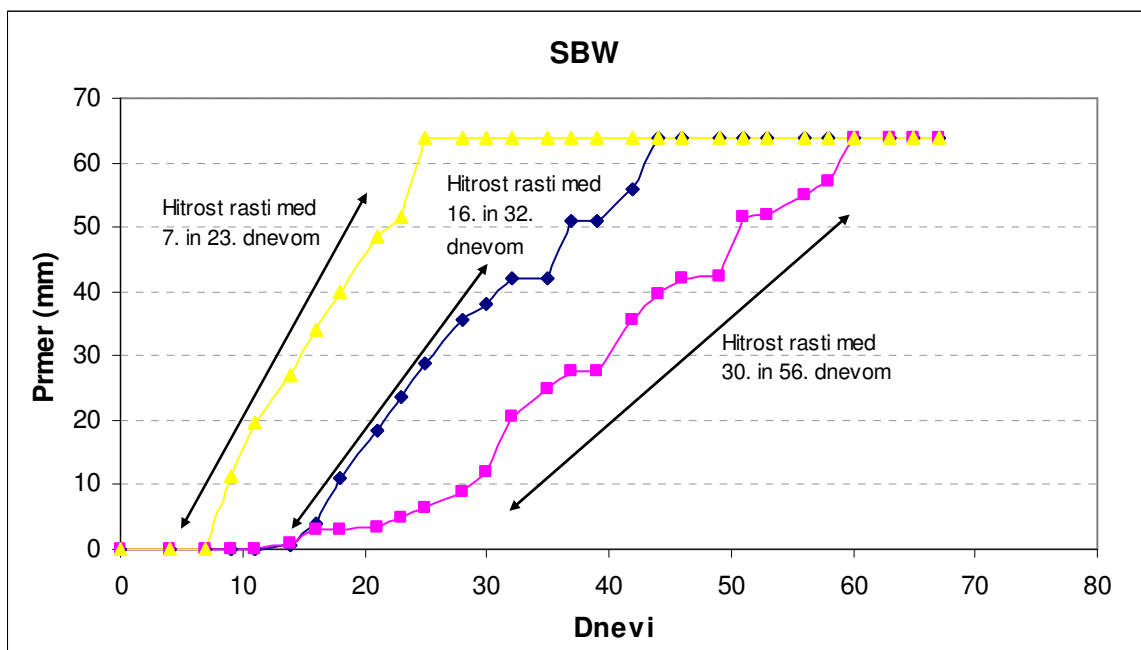
3.3.2 Izračun hitrosti rasti

Za potrebe statistične analize in za lažjo interpretacijo podatkov smo za vsako petrijevko posebej izračunali hitrost rasti glivne kolonije v njej. Pri tem smo si pomagali s predhodno izrisanimi grafi, ki prikazujejo rast vseh treh ponovitev za posamezen izolat na vsakem gojišču posebej.

Na začetek rasti glive na novem gojišču takoj po precepljanju lahko vpliva več dejavnikov. Vcepke praviloma jemljemo z roba kolonije, kjer je micelij aktivno rastoč. Včasih lahko nehote zajamemo premalo micelija. Del micelija se lahko poškoduje zaradi previsoke temperature cepilnih instrumentov, ki jih predhodno steriliziramo nad gorečim plamenom. Tudi ko glivo precepimo na novo gojišče, lahko pride do poškodb na miceliju, ko vcepek položimo na agar. Vplive teh dejavnikov smo poskušali zmanjšati s pazljivo izvedbo precepljanja.

Ko gliva že nekaj časa raste na gojišču in porablja razpoložljiva hranila, začne le-teh primanjkovati. Tako začne tudi hitrost njene rasti pešati. Da bi izključili vplive začetnega prilagajanja glive na nove razmere in pomanjkanje hranil v gojišču na koncu njene rasti, smo hitrost merili samo na območju, kjer smo sklepali, da je gliva rasla nemoteno, brez negativnih vplivov.

Hitrost smo izračunali tako, da smo prirastek premera (mm) delili s časom (dnevi), v katerem je gliva prirasla za določen premer. Primer izbire podatkov za izračun je prikazan na sliki 6.



Slika 6: Izračun hitrosti rasti

3.3.3 Statistična analiza

Podatke o hitrosti rasti smo analizirali z računalniškim programom SPSS 17.0. S statistično analizo smo ugotavljali statistično značilne razlike v hitrosti rasti.

Pri statistični analizi smo najprej izvedli Levenov test homogenosti varianc ($p > 0,05$), saj je homogenost varianc eden od pogojev za analizo variance. Kjer je test pokazal, da se variance med skupinami statistično razlikujejo, torej niso homogene, smo namesto enosmerne analize variance (ANOVA) uporabili neparametrični Kruskal-Wallisov test za enosmerno analizo variance. Stopnja tveganja je bila 5-odstotna.

3.4 IZOLACIJE

Za preskušanje uspešnosti metod izolacije glive *Chalara fraxinea* smo poskusno opravili izolacije glive. Opravili smo izolacije gliv z drevesc velikega jesena s področja v okolici Kamnika (x: 119470, y: 471433), za katera smo sumili, da so okužena z glivo *C. fraxinea* (slika 7).



Slika 7: Okuženo mladje velikega jesena (*Fraxinus excelsior*) v okolici Kamnika (Foto: Gal Fidej)

25. 3. 2011 smo nabrali 1–4-letne in približno 1 cm debele poganjke mladih, do 5 let starih drevesc, ki so kazala znake okužbe, za katero smo domnevali, da je bila povzročena zaradi *C. fraxinea* in da ni starejša od enega leta. Na skorji poganjkov so bile vidne vzdolžne rjavkaste nekroze (slika 8). Do izolacije smo poganjke shranili v plastičnih vrečah. Izolacije smo naredili tri dni kasneje (28. 3. 2011) iz 20 primerkov v dveh ponovitvah (2 petrijevki) s štirimi koščki okuženega lesa na petrijevko.



Slika 8: Simptomi okužbe z glivo *Chalara fraxinea* – nekroza na poganjku velikega jesena (*Fraxinus excelsior*) (Foto: Gal Fidej)

Centimeter debele veje smo začeli rezati na manjše koščke (prečno na poganjek) že več centimetrov (okoli 5 cm) pred nekrozo skorje, saj so nekroze v lesu praviloma daljše od nekroz v skorji (Ogris, 2009).

Izolacije glive *C. fraxinea* iz debelejših poganjkov (3–4 cm), ki vključujejo les in skorjo, so manj uspešne. Vzrok temu je, da se v nekrotični skorji praviloma nahaja tudi veliko število hitreje rastočih vrst gliv, ki prerastejo počasi rastočo glivo *C. fraxinea*. Izolacije je zaradi tega bolje narediti iz manjših koščkov lesa na meji med zdravim in zaradi domnevne okužbe diskoloriranim lesom (Bakys in sod., 2009).

Naš cilj je bil pridobiti vzorce, ki se nahajajo na prehodu iz okuženega v zdrav les. Ko smo zarezali do mesta, kjer je bila v lesu že vidna sled okužbe, smo s prečnim rezanjem

prenehali in kos poganjka prerezali še vzdolžno. Tukaj smo iz vsake polovice odrezali po štiri $5 \times 2 \times 2$ mm velike koščke okuženega lesa brez skorje in stržena.

Po sterilizaciji s 3 % aktivnega klora (Varekina, NaOCl, 6 % aktivnega klora 50 %, destilirana voda 50 %) smo koščke namestili v petrijevke (7 cm premera) z 2 % sladnim agarjem (MEA; 20 g l⁻¹ malt extract Bacto, 15 g l⁻¹ agar Technical Difco). Kulture so nato rasle v inkubatorju pri temperaturi 22 °C in v temi. Nekateri izolati so začeli rasti že v enem tednu.

Pri določanju vrste izolirane glive, torej pri ugotavljanju, ali je izolirana gliva v resnici *C. fraxinea*, je potrebno opazovati, kakšne so fialide in kakšni so konidiji. Kolonije smo premestili v hladilnik s 4 °C, kjer so se razvile fialide in konidiji. S pomočjo mikrosopa Olympus BX 51 in kamere Nikon smo v računalniškem programu NIS-Elements BR. 2.30, naredili slike in meritve. Izmerili smo dolžine in širine fialid. Širino smo merili na najširšem delu fialide. V vzorec smo zajeli 23 fialid in iz dobljenih podatkov izračunali povprečno širino, povprečno dolžino ter minimalno in maksimalno vrednost dolžine in širine. Postopek smo ponovili pri merjenju velikih in malih konidijev, le da smo pri malih konidijih v vzorec zajeli 40 primerkov, pri velikih konidijih pa 10.

Rezultate meritev smo primerjali z vrednostmi, ki jih je navedel T. Kowalski, ko je opisal novo vrsto glive.

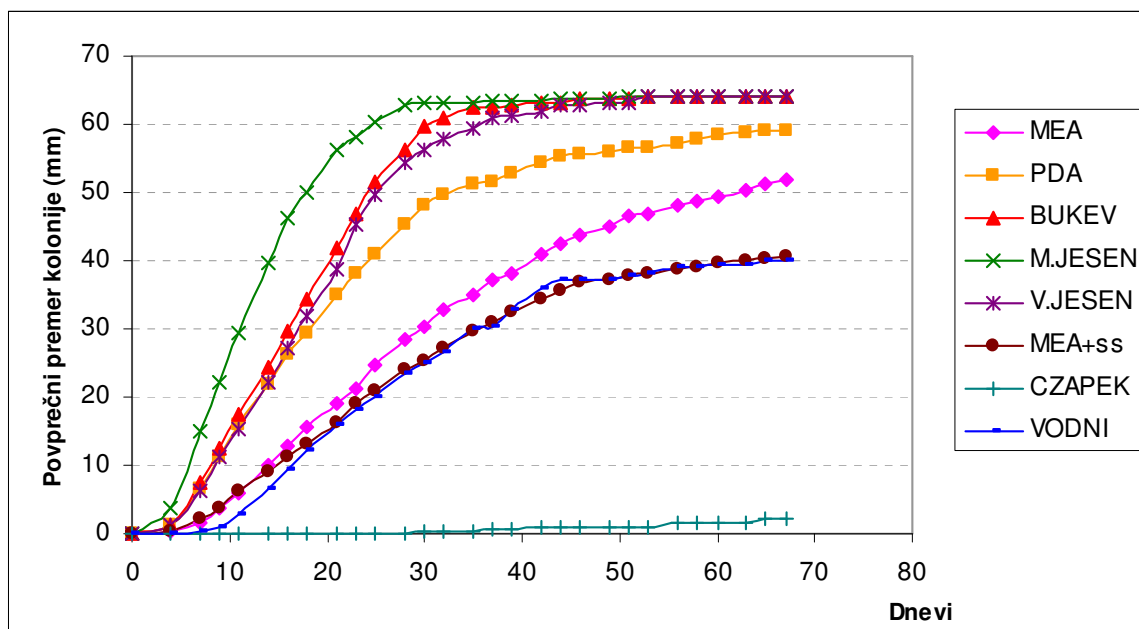
4 REZULTATI

4.1 VPLIV GOJIŠČ NA RAST

4.1.1 Potek rasti glive na različnih gojiščih

Podatke merjenja premerov kolonij smo najprej uporabili za prikaz poteka rasti glive na različnih gojiščih. Na agarju z malim jesenom so glive že pri prvem merjenju (4. dan) zrasle povprečno za 4 mm (slika 9) in končale z rastjo ter prerasle celotno petrijevko najhitreje. Celotno petrijevko so prerasle tudi na agarju z bukvijo in na agarju z velikim jesenom. Rast gliv je bila hitra tudi na krompirjevem agarju, vendar tam glive niso prerasle celotne petrijevke, saj se je njihova rast prej ustavila.

Na vodnem agarju, na sladnem agarju in na sladnem agarju z dodanim streptomycin sulfatom je bila rast od začetka dokaj počasna, nato so nekaj časa enakomerno rasle, pri določenem premeru pa se je rast začela upočasnjevati in glive v osmih tednih niso prerasle celih petrijevok.



Slika 9: Potek rasti glive na različnih gojiščih

4.1.2 Hitrost rasti glive na različnih gojiščih

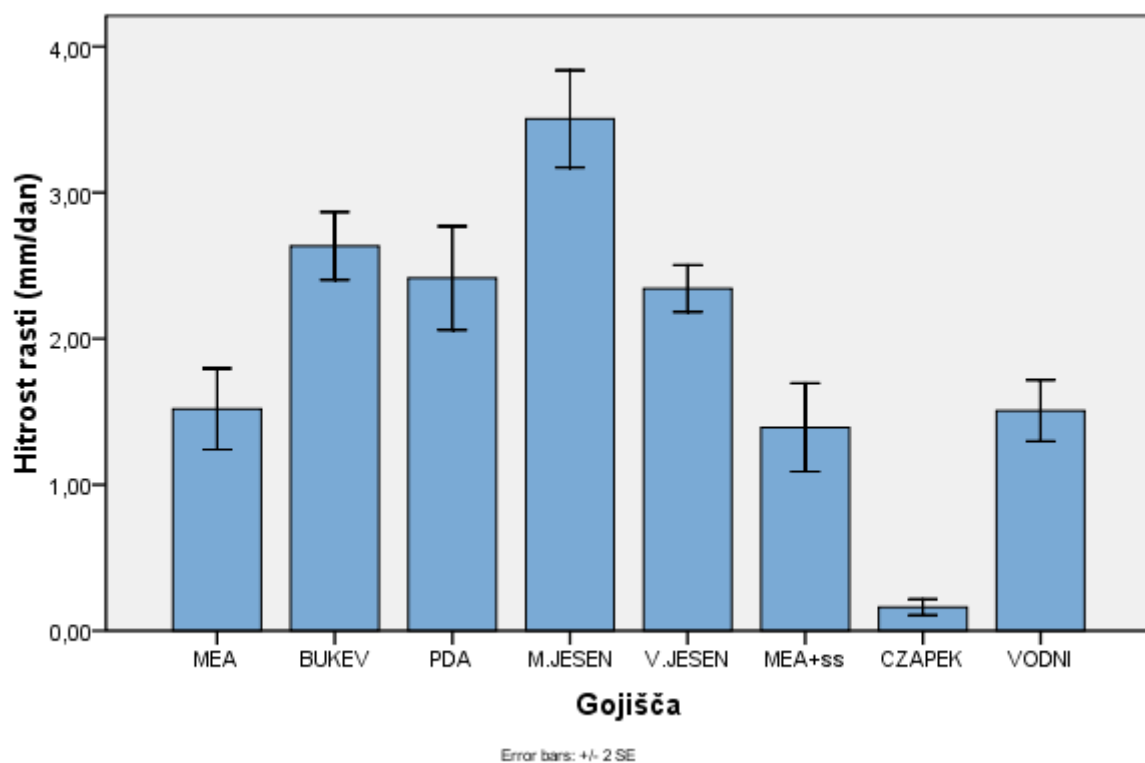
Hitrost rasti glive se je razlikovala glede na gojišče (preglednica 3, slika 10). Gliva je najhitreje rasla na gojiščih, ki smo jih pripravili iz žaganja izbranih drevesnih vrst. Na prvem mestu je bil agar z malim jesenom, sledil mu je agar z bukvijo. Na krompirjevem agarju je rasla nekoliko hitreje kot na agarju z velikim jesenom. Na vodnem agarju je bila hitrost rasti 1,51 mm/dan in s tem skoraj povsem enaka kot na sladnem agarju (1,52 mm/dan). Rast na sladnem agarju z dodatkom streptomycin sulfata je bila le nekoliko počasnejša (1,39 mm/dan). Daleč najpočasnejšo rast smo opazili na Czapek agarju.

Pri statistični analizi je Levenov test homogenosti varianc ($p > 0,05$) pokazal, da se variance med skupinami statistično razlikujejo. Tako smo uporabili neparametrični Kruskal-Wallisov test za enosmerno analizo variance. Test je pokazal, da so med medianami hitrosti po skupinah statistično značilne razlike. S tabelo razlik med povprečnimi rangi smo ugotovili, med katerimi gojišči so statistično značilne razlike. Med katerimi gojišči ni razlik, smo označili v preglednici 3. Gojišča z isto črko se med seboj statistično značilno ne razlikujejo pri stopnji značilnosti $\alpha = 0,05$.

Preglednica 3: Hitrost rasti glive na posameznih gojiščih in standardni odklon

Šifra gojišča	Hitrost rasti (mm/dan)	Standardni odklon
MEA	1,52ab*	$\pm 0,83$
BUKEV	2,63 c	$\pm 0,70$
PDA	2,41abc	$\pm 1,06$
M.JESEN	3,50c	$\pm 1,00$
V.JESEN	2,34bc	$\pm 0,48$
MEA+ss	1,39a	$\pm 0,91$
CZAPEK	0,16d	$\pm 0,17$
VODNI	1,51ab	$\pm 0,63$

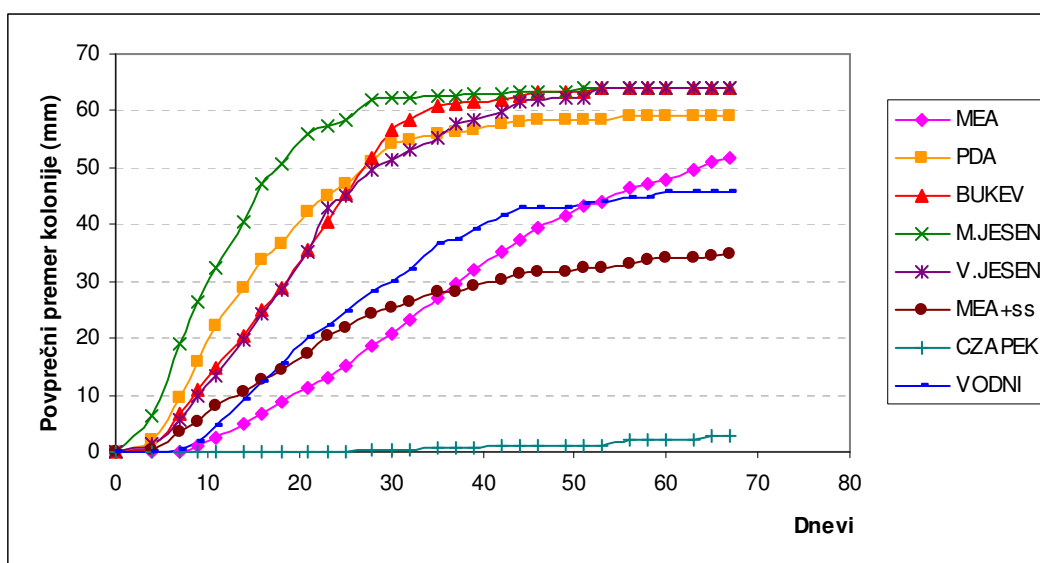
*hitrosti z isto črko se glede na Kruskal-Wallisov test ($\alpha = 0,05$) med seboj statistično značilno ne razlikujejo



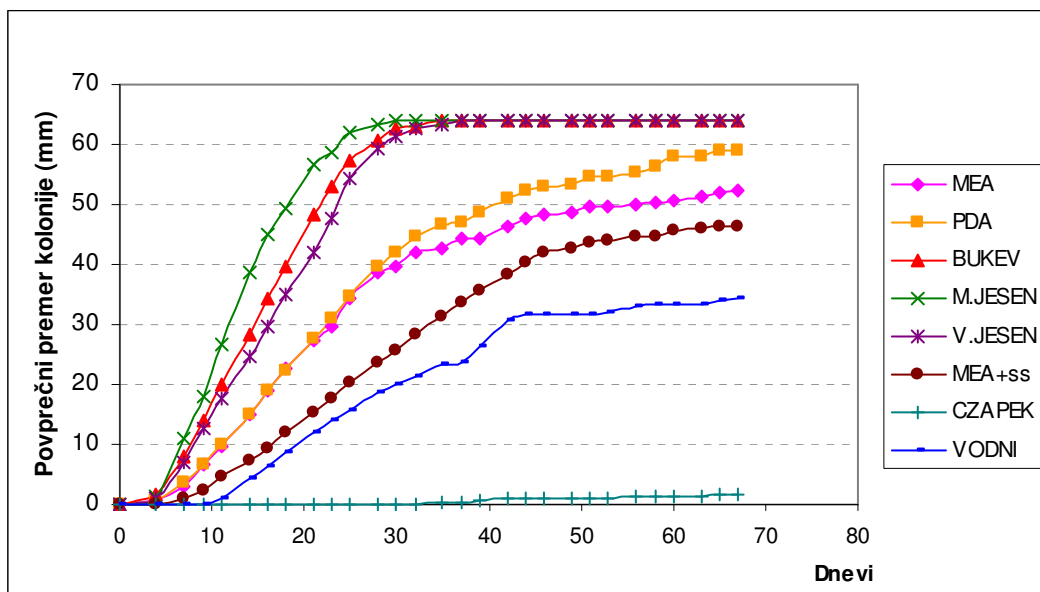
Slika 10: Hitrost rasti glive na posameznih gojiščih. Prikazane so povprečne hitrosti in $\pm$ standardna napaka.

4.1.3 Potek rasti poljskih in slovenskih izolatov na različnih gojiščih

Slovenski in poljski izolati so imeli na istih gojiščih dokaj podoben potek rasti (sliki 11 in 12). Na agarju z velikim jesenom, na agarju z bukvijo in na agarju z malim jesenom so enakomerno rasli, dokler niso prerasli celotne petrijevke. Izolati se nekoliko razlikujejo v rasti na krompirjevem agarju. Krivulja rasti je nekoliko bolj sploščena pri slovenskih izolatih (kar nakazuje na počasnejšo rast), vendar pa oboji izolati na koncu dosežejo skoraj končni možni premer (prerastejo petrijevke). Krivulji rasti na sladnem agarju in na sladnem agarju s streptomycin sulfatom sta pri slovenskih izolatih ves čas vzporedni. Krivulja, ki prikazuje rast na sladnem agarju poteka nekoliko višje. Pri poljskih izolatih pa se krivulji sekata. Poljski izolati so na sladnem agarju s streptomycin sulfatom na začetku rasli hitreje.



Slika 11: Prikaz poteka rasti poljskih izolatov na različnih gojiščih



Slika 12: Prikaz poteka rasti slovenskih izolatov na različnih gojiščih

4.1.4 Hitrost rasti poljskih in slovenskih izolatov na različnih gojiščih

Za vsako gojišče posebej smo ugotavljali razlike v hitrosti rasti med poljskimi in slovenskimi izolati glive. Najprej smo izvedli Levenov test homogenosti varianc. Homogenost varianc smo potrdili pri agarju z malim jesenom, pri vodnem in krompirjevem agarju in pri sladnem agarju s streptomycin sulfatom. Nadaljevali smo z enosmerno analizo variance. Pri ostalih gojiščih, kjer predpostavka o homogenosti varianc ni bila izpolnjena, smo izvedli Kruskal-Wallisov test neparametrične analize variance. Rezultati statistične analize so pokazali razlike v hitrosti rasti med poljskimi in slovenskimi izolati na bukovem, sladnem in Czapek agarju pri stopnji značilnosti $\alpha = 0,05$. Na ostalih gojiščih ni bilo statistično značilnih razlik v hitrosti rasti med poljskimi in slovenskimi izolati.

Slovenski izolati so v povprečju rasli hitreje kot poljski. Višja hitrost rasti je bila zabeležena na vseh gojiščih, razen na krompirjevem agarju in na vodnem agarju. Na omenjenih dveh gojiščih so poljski izolati rasli hitreje kot slovenski. (preglednica 4, slika 13).

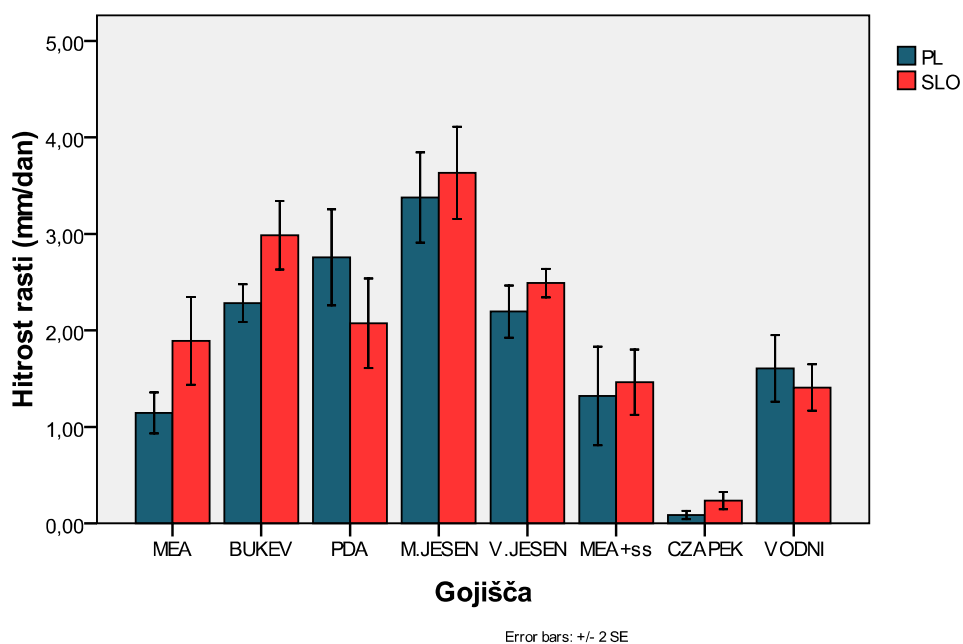
Podobno kot pri analizi hitrosti rasti glive na različnih gojiščih, kjer smo obravnavali vse podatke brez delitve izolatov na poljske in slovenske, se je tudi tukaj pokazala podobna »produktivnost« posameznih gojišč. Tako poljski kot slovenski izolati so najhitreje rasli na agarju iz malega jesena in najpočasneje na Czapek agarju.

Vendar pa se je pokazalo, da so slovenski izolati hitreje rasli na agarju z velikim jesenom kot na krompirjevem agarju. Poljski izolati pa so na krompirjevem agarju rasli hitreje kot na agarju z velikim jesenom in celo hitreje kot na agarju z bukvijo.

Preglednica 4: Hitrost rasti poljskih in slovenskih izolatov glive na posameznih gojiščih in standardni odklon

Šifra gojišča	Poljski		Slovenski	
	Hitrost (mm/dan)	Standardni odklon	Hitrost (mm/dan)	Standardni odklon
MEA*	1,15	±0,45	1,89	±0,96
BUKEV*	2,28	±0,42	2,99	±0,75
PDA	2,76	±1,06	2,07	±0,99
M.JESEN	3,38	±0,99	3,63	±1,01
V.JESEN	2,20	±0,57	2,49	±0,31
MEAss	1,32	±1,08	1,46	±0,72
CZAPEK*	0,09	±0,09	0,24	±0,19
VODNI	1,61	±0,73	1,41	±0,51

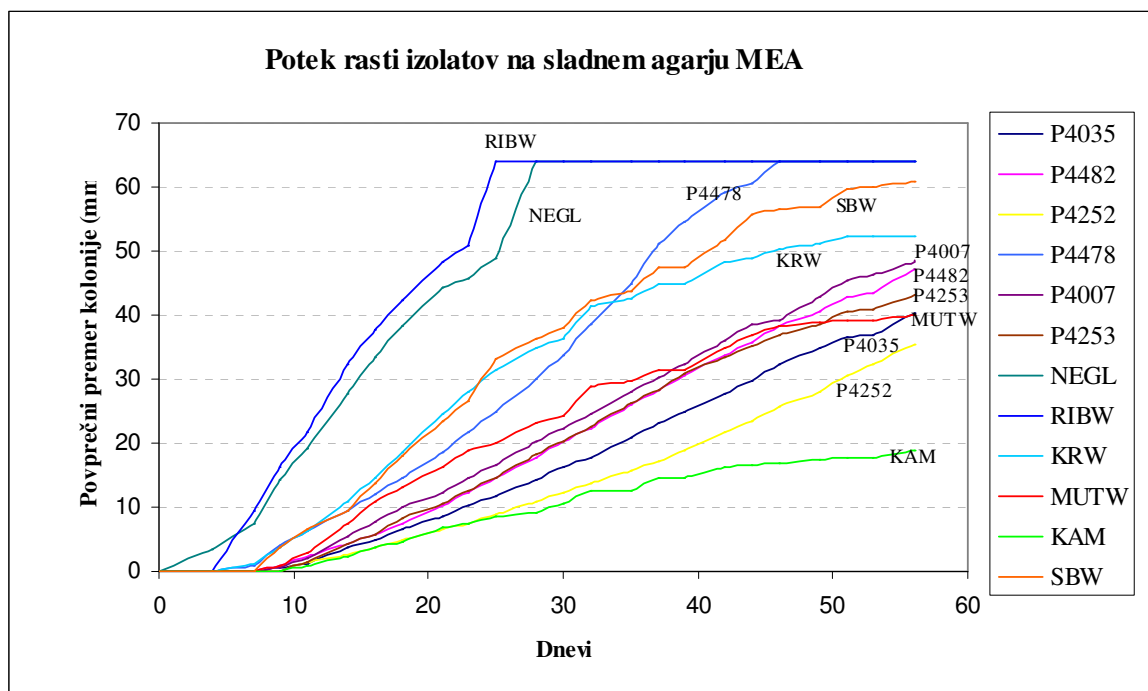
* Označuje gojišča, na katerih so med poljskimi in slovenskimi izolati statistično značilne razlike v hitrosti rasti.



Slika 13: Primerjava hitrosti rasti poljskih in slovenskih izolatov glive na posameznih gojiščih. Prikazane so povprečne hitrosti in $\pm$ standardna napaka.

4.2 RAST POSAMEZNIH IZOLATOV GLIVE *Chalara fraxinea*

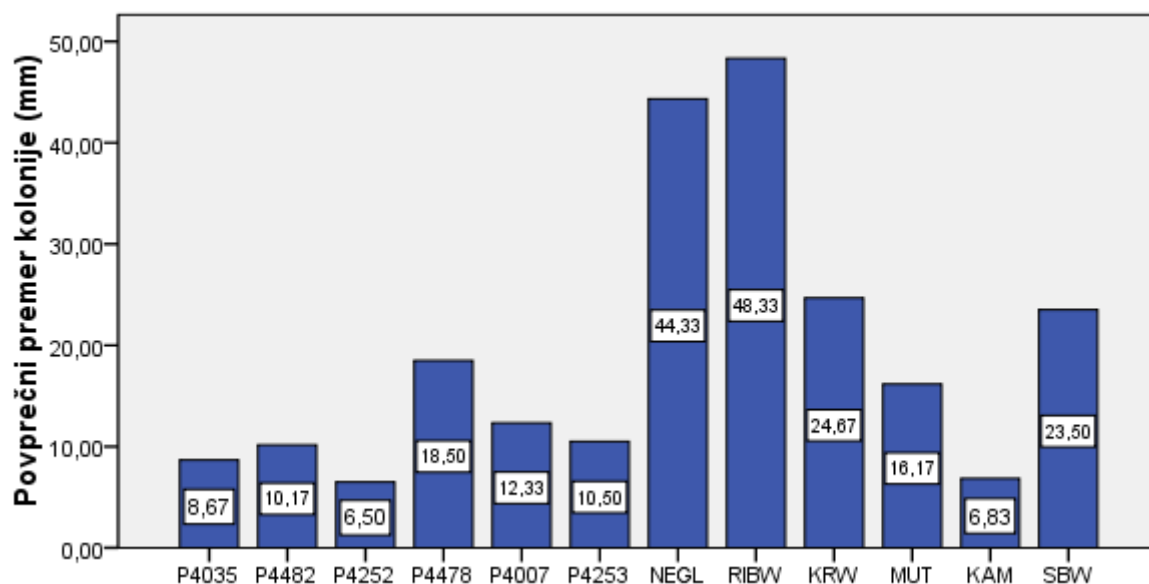
Kako različen je bil potek rasti posameznih izolatov, je prikazano na sliki 14, in sicer na primeru sladnega agarja. Celotno petrijevko sta najhitreje prerasla izolata RIBW in NEGL. Nenaden skok krivulj, tik preden dosežeta maksimalno vrednost, je posledica tega, da je gliva prerasla petrijevko. Izolati P4478, SBW in KRW so za začetek rasti potrebovali dalj časa, njihova rast pa se je začela upočasnjevati, še preden so dosegli robove petrijevke. Izolati P4007, P4482, P4253, MUTW, P4035 in P4252 so na začetku (približno do 10. dne) rasli počasneje, nato pa so dokaj enakomerno in počasi priraščali. Po osmih tednih, ko smo z merjenjem zaključili, nobeden od njih ni prerasel petrijevke. Za začetek rasti je najdlje potreboval izolat KAM, njegova rast se je kmalu upočasnila, pa tudi zrasel je najmanj.



Slika 14: Potek rasti izolatov na sladnem agarju

Po treh tednih (21 dni) inkubacije na sladnem agarju so premeri glivnih kolonij (brez upoštevanja premera vcepka – 6 mm) znašali od 6,50 mm pri poljskem izolat P4252 pa do 48,33 mm pri slovenskem izolat RIBW (slika 15). Velikost premera vidno izstopa pri dveh izolatih, in sicer NEGL in RIBW. Po treh tednih sta velik premer dosegla tudi KRW

(24,67 mm) in SBW (23,50 mm). Povprečni premer slovenskih izolatov MUTW (16,17 mm) in KAM (6,83 mm) je primerljiv s premeri vseh poljskih izolatov, katerih povprečni premeri se gibljejo med 6,50 mm in 18,50 mm.



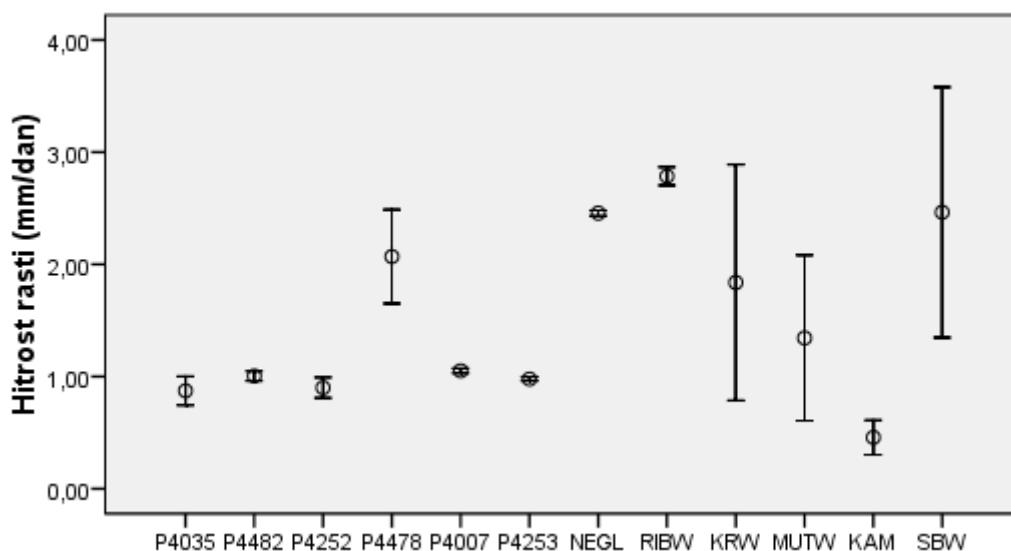
Slika 15: Povprečni premer kolonij različnih izolatov glive *Chalara fraxinea* po 21 dneh rasti na sladnem agarju pri temperaturi 22 °C in v temi.

4.2.1 Sladni agar

Primerjava hitrosti rasti med izolati na sladnem agarju je pokazala veliko variabilnost med posameznimi izolati. Pri izolatih SBW, KRW, MUTW in P4478 smo opazili tudi veliko variabilnost med samimi ponovitvami (slika 16)

Največjo povprečno hitrost je dosegel izolat RIBW (2,70 mm/dan), najnižjo pa izolat KAM (0,46 mm/dan). Pri izolatih SBW, KRW in MUTW so standardni odklon in standardne napake veliki (priloga A).

Kruskal-Wallisov test je pokazal, da so statistično značilne razlike v hitrosti rasti med posameznimi izolati (priloga B).

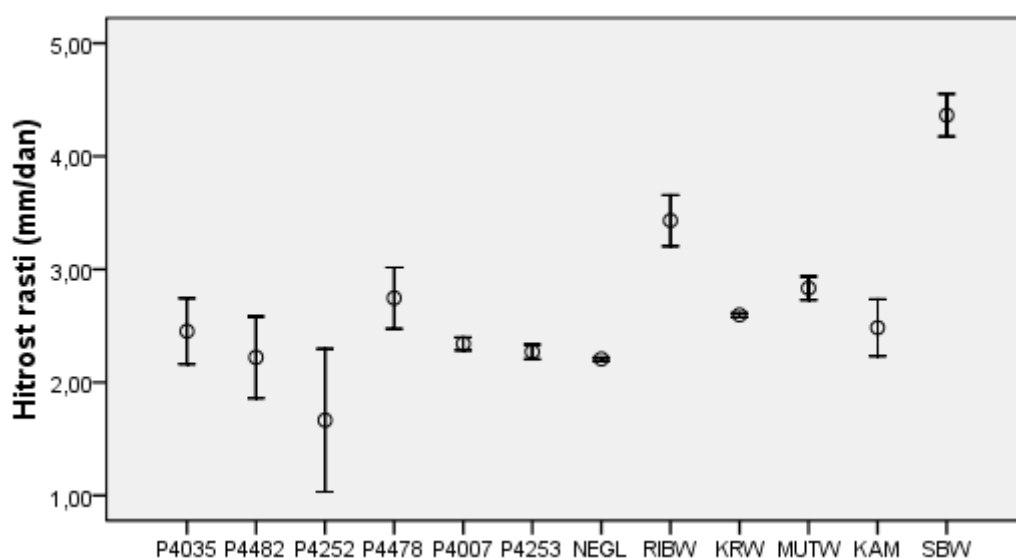


Slika 16: Hitrost rasti izolatov na sladnem agarju. Prikazane so povprečne hitrosti in $\pm$ standardna napaka

4.2.2 Agar z bukvijo

Na agarju z bukvijo je bil razpon povprečnih hitrosti med 1,67 mm/dan pri P4252 in 4,36 mm/dan pri SBW. Tukaj so vsi izolati rasli hitreje kot na sladnem agarju. Predvsem pri slovenskih izolatih je bila standardna napaka manjša (slika 17, priloga A).

Ugotovili smo statistično značilne razlike v hitrosti rasti med izolati (priloga B).

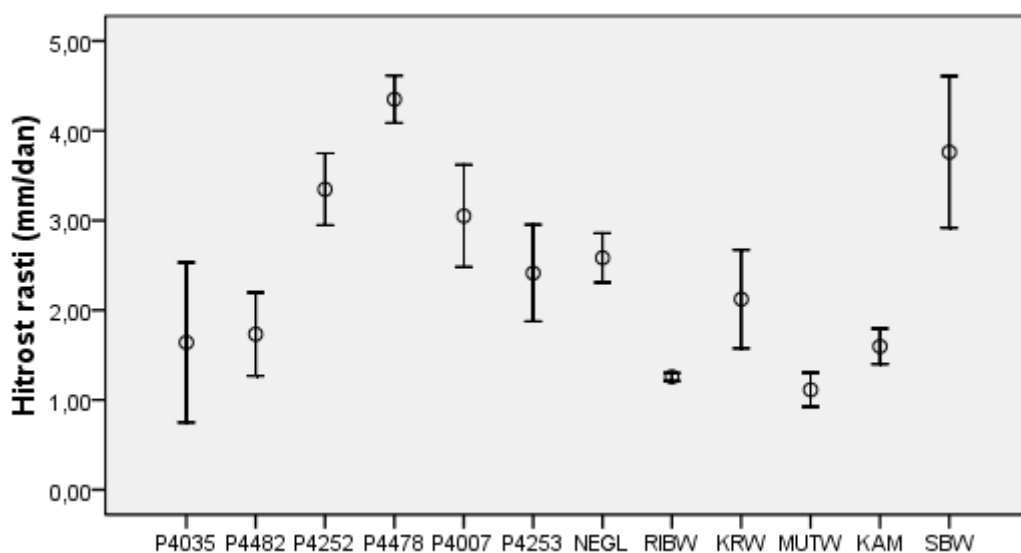


Slika 17: Hitrost rasti izolatov na agarju z bukvijo. Prikazane so povprečne hitrosti in $\pm$ standardna napaka

4.2.3 Krompirjev agar

Tudi na krompirjevem agarju so bile razlike v hitrosti rasti statistično značilne. Najnižja povprečna hitrost je bila 1,11 mm/dan pri MUTW, najvišja pa 4,35 mm/dan pri P4478. Opazili smo, da so poljski izolati na tem gojišču rasli hitreje od slovenskih, kot smo že omenili pri primerjavi hitrosti rasti poljskih in slovenskih izolatov na različnih gojiščih (slika 18, priloga A).

Levenov test homogenosti varianc je pokazal, da so variance homogene, zato smo lahko upoštevali rezultat analize variance, da so med izolati statistično značilne razlike (priloga B).

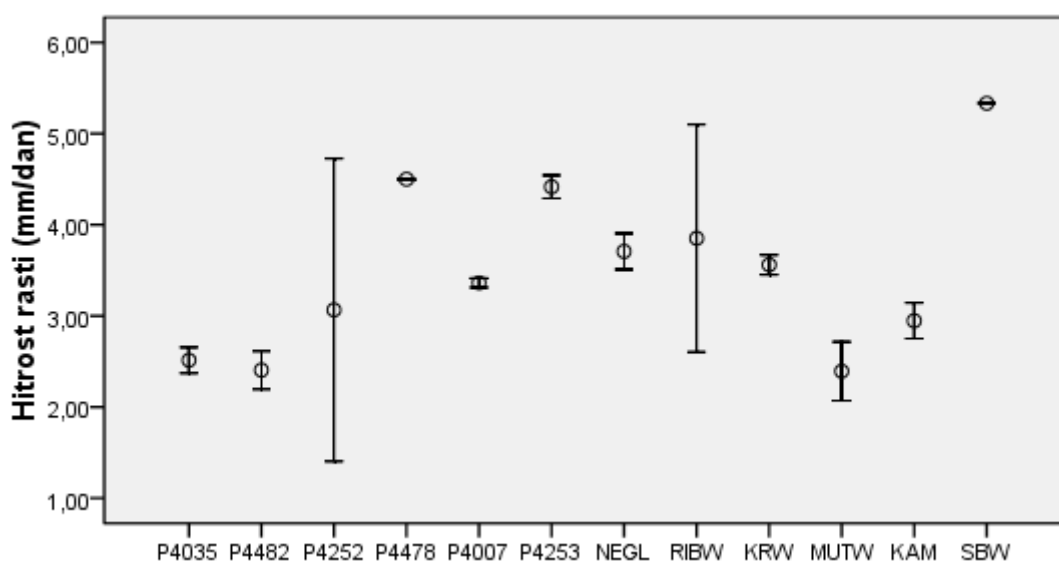


Slika 18: Hitrost rasti izolatov na krompirjevem agarju. Prikazane so povprečne hitrosti in $\pm$ standardna napaka

4.2.4 Agar z malim jesenom

Na agarju z malim jesenom so izolati rasli najhitreje. Najnižjo hitrost (2,39 mm/dan) je imel ponovno izolat MUTW, najvišjo (5,33 mm/dan) pa SBW. Velika odstopanja med ponovitvami so bila le pri izolatih P4252 in RIBW. Pri ostalih izolatih sta bila standardni odklon in standardna napaka majhna (slika 19, priloga A).

Kruskal-Wallisov test je pokazal, da so med izolati statistično značilne razlike (priloga B).

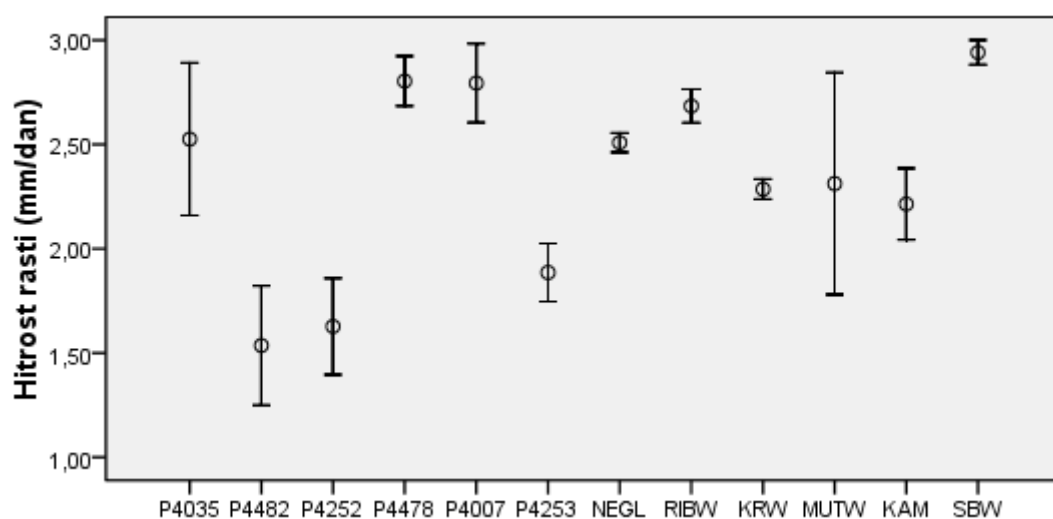


Slika 19: Hitrost rasti izolatov na agarju z malim jesenom. Prikazane so povprečne hitrosti in $\pm$ standardna napaka

4.2.5 Agar z velikim jesenom

Na agarju z velikim jesenom je najpočasneje rasel izolat P4482 (1,54 mm/dan), najhitreje pa ponovno izolat SBW (2,94 mm/dan) (slika 20, priloga A).

Kruskal-Wallisov test je pokazal, da so med izolati statistično značilne razlike (priloga B).

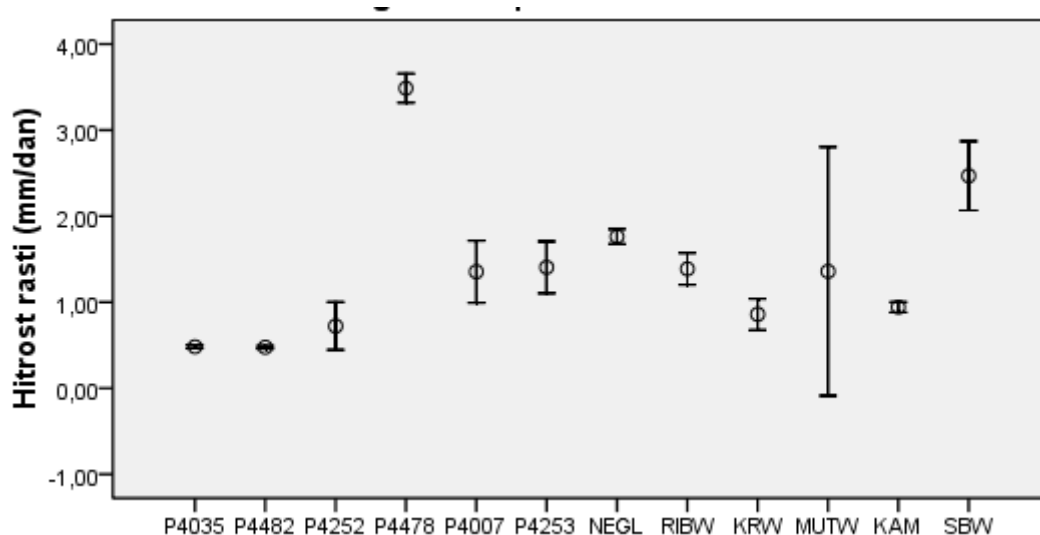


Slika 20: Hitrost rasti izolatov na agarju z velikim jesenom. Prikazane so povprečne hitrosti in $\pm$ standardna napaka

4.2.6 Sladni agar s streptomycin sulfatom

Na sladnem agarju z dodanim streptomycin sulfatom je bila najnižja hitrost rasti 0,48 mm/dan pri dveh izolatih, in sicer P4035 in P4482. Najhitreje je rasel izolat P4478, s 3,49 mm/dan. Omenjeni izolat je najhitreje rasel tudi na krompirjevem agarju (slika 21, priloga A).

Kruskal-Wallisov test je pokazal, da so med izolati statistično značilne razlike (priloga B).

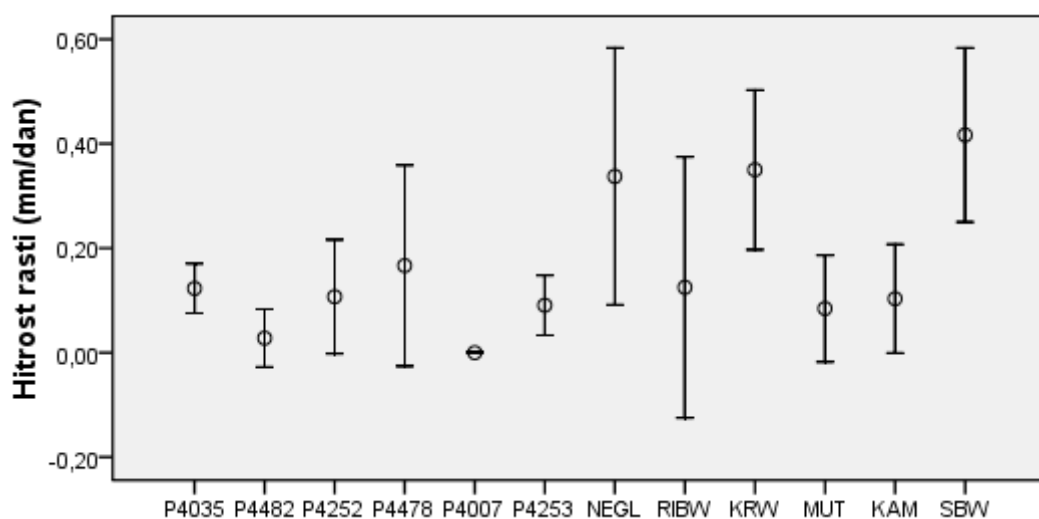


Slika 21: Hitrost rasti izolatov na sladnem agarju s streptomycin sulfatom. Prikazane so povprečne hitrosti in $\pm$ standardna napaka

4.2.7 Czapek agar

Na Czapek agarju je bila rast vseh izolatov opazno ovirana. Tudi variabilnost med ponovitvami pri posameznem izolatu je bila velika. Pri izolatu P4007 nobena izmed ponovitev ni kazala znakov rasti. Najhitreje je rasel izolat SBW, pa še ta le 0,42 mm/dan. Tudi začetek same rasti je bil tukaj zakasnen. Prvi izolati so začeli rasti šele slabe tri tedne po cepitvi. Rast je bila počasna, v povprečju le 0,42 mm/dan (slika 22, priloga A). Na izolatu KRW smo opazili značilno obliko hif, ki so se razlikovale od vseh ostalih (slika 23).

Kruskal-Wallisov test je pokazal, da so med izolati statistično značilne razlike (priloga B).



Slika 22: Hitrost rasti izolatov na Czapek agarju. Prikazane so povprečne hitrosti in $\pm$ standardna napaka

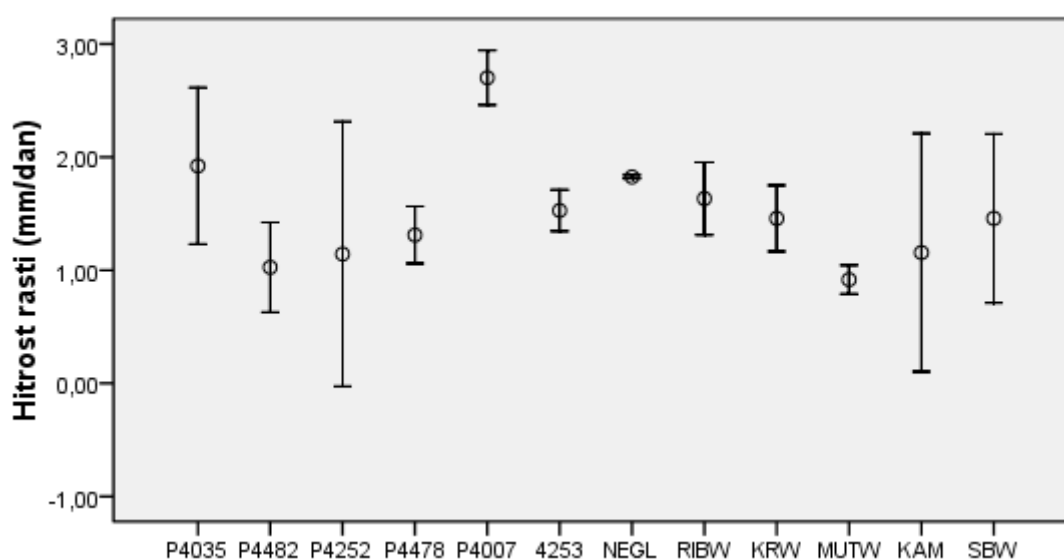


Slika 23: Značilna oblika hif glive *Chalara fraxinea*, izolata KRW, na Czapek agarju (Foto: Katarina Flajšman)

4.2.8 Vodni agar

Na vodnem agarju so se povprečne hitrosti rasti izolatov gibale med 0,92 mm/dan pri MUTW do 2,70 mm/dan pri P4007 (slika 24, priloga A).

S Kruskal-Wallisovim neparametričnim testom za enosmerno analizo variance smo ugotovili, da na vodnem agarju med izolati ni statistično značilnih razlik (priloga B).

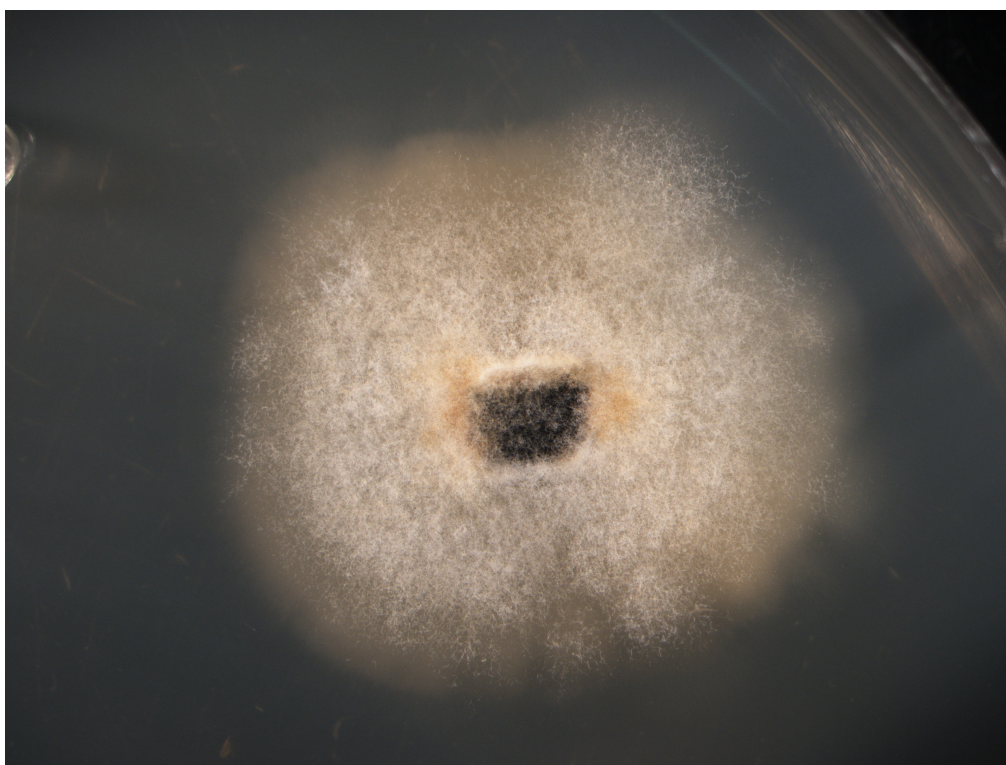


Slika 24: Hitrost rasti izolatov na vodnem agarju. Prikazane so povprečne hitrosti in $\pm$ standardna napaka

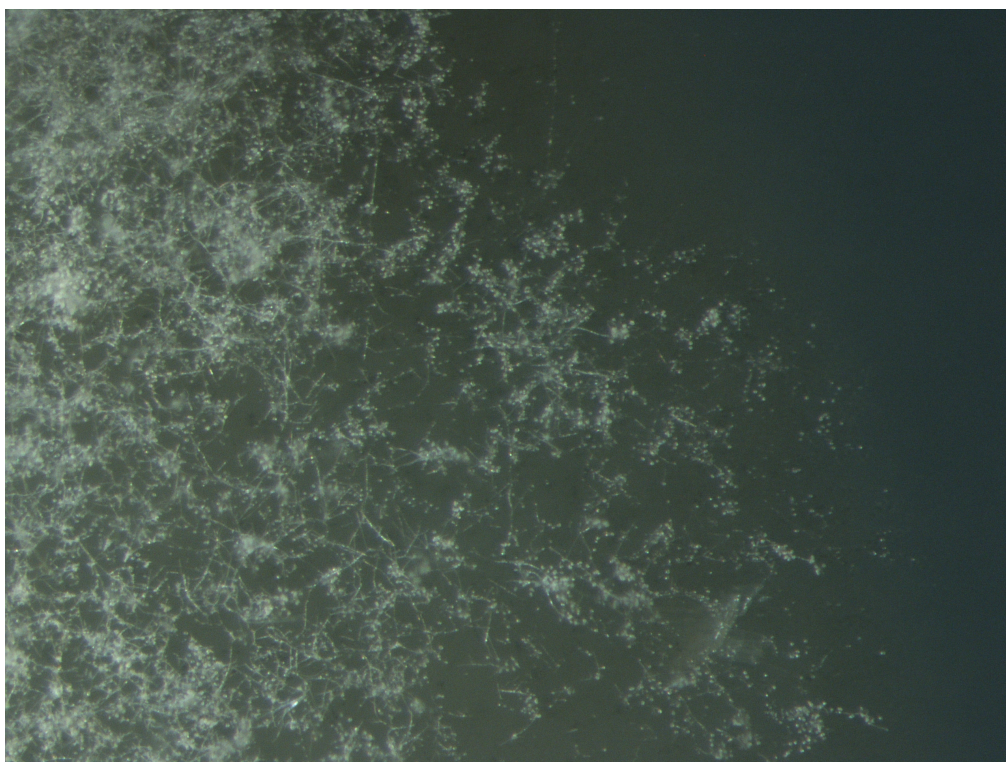
4.3 REZULTATI IZOLACIJ

Okoli koščka lesa se je razvil belkast micelij glive (slika 25). Že pod lupo so bila opazna nespolna trosišča (slika 26). Pod mikroskopom smo lahko opazovali male in velike konidije, fialide in konidije, združene v obliki sluzastih kapljic (slike 27–29).

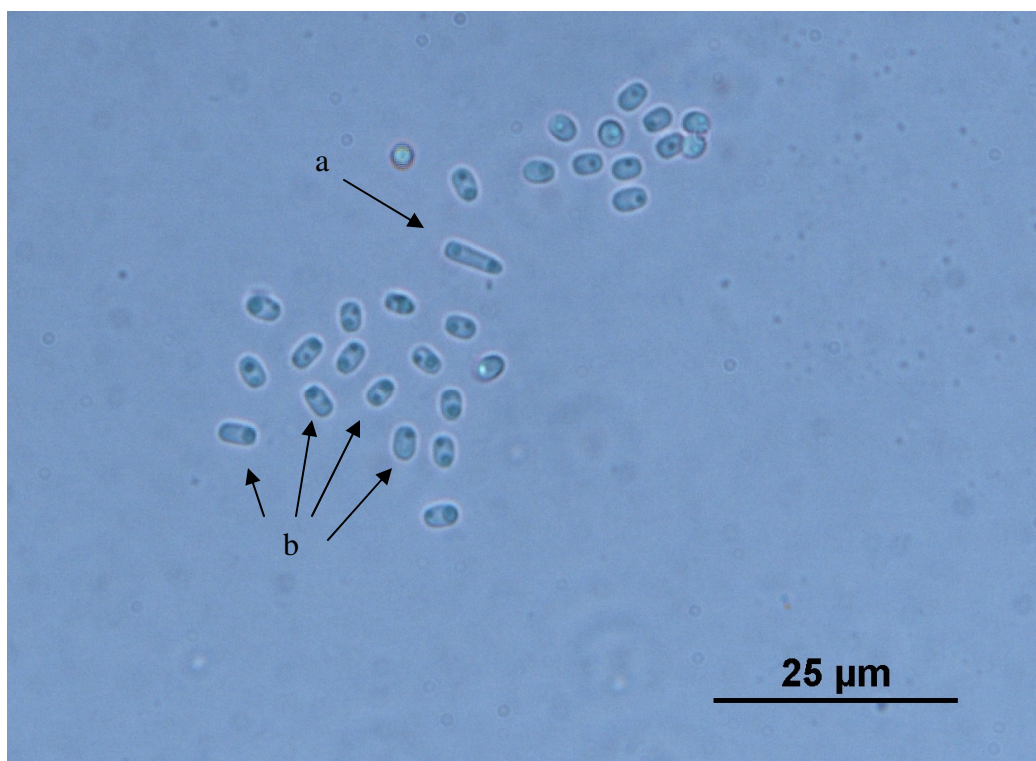
Celotne fialide so bile dolge 16,57 (13,44–20,8) μm ($n = 23$) in na najširšem delu široke 4,5 (3,61–5,66) μm . Velikost prvih konidijev (veliki konidiji) je bila 6,74 (5,98–7,89) $\times$ 1,88 (1,67–2,19) μm ($n = 10$), velikost ostalih (malih) konidijev pa 3,46 (2,95–4,02) $\times$ 2,2 (1,92–2,48) μm ($n = 40$). Opazovane morfološke značilnosti so se ujemale z opisom glive *C. fraxinea*, kot so jo opisali N.Ogris, T. Hauptman in D. Jurc (2009) ter Kowalski (2006).



Slika 25: Izolirana glivna kolonija na sladnem agarju pod lupo Olympus SZX 12 (Foto: Tine Hauptman)



Slika 26: Trosišča na sladnem agarju pod lupo Olympus SZX 12 (Foto: Tine Hauptman)



Slika 27: a. Prvi nastali veliki konidij; b. kasneje nastali mali konidiji (Foto: Tine Hauptman)



Slika 28: Konidiji v obliki sluzastih kapljic (Foto: Tine Hauptman)



Slika 29: Fialide na hifah (Foto: Tine Hauptman)

5. RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Vpliv gojišč na rast

Želeli smo ugotoviti, ali so razlike v rasti glive na različnih gojiščih. Najprej smo primerjali hitrost rasti glive na različnih gojiščih, ne glede na to, za kateri izolat gre. Pri statistični analizi smo uporabili podatke vseh izolatov skupaj.

V literaturi nismo zasledili, da bi glivo gojili še na katerem drugem gojišču, razen na sladnem agarju in na sladnem agarju s streptomycin sulfatom. Kowalski (Kowalski 2006) je opravil izolacije glive na sladni agar s streptomycin sulfatom, vendar so podatki o hitrosti rasti vezani le na sladni agar. Hitrost rasti na sladnem agarju je relativno počasna (Kowalski, 2006; Kowalski in Bartnik, 2010).

Ugotovili smo, da na nekaterih gojiščih gliva raste hitreje kot na drugih in da so med gojišči statistično značilne razlike.

Gliva je najhitreje rasla na agarju z malim jesenom (3,5 mm/dan), kar je presenetljivo. Za mali jesen se sklepa, da je manj dovzeten za okužbe z glivo *Chalara fraxinea*, kar se pojasnjuje z dejstvom, da naravne okužbe še niso opazili (Kirisits in sod., 2009a). Kirisits in sod. (2009a) so naredili poskus z inokulacijo glive *C. fraxinea* na mali jesen (*Fraxinus ornus*). V 1-letne sejanke malega jesena so inokulirali 2 različna izolata in v obeh primerih je gliva izkazala patogenost do *F. ornus*. Pri prvem poskusu so nekatere rastline kazale znake venenja listov ter odmiranje in nekroze enakih dimenzij kot pri *F. excelsior*. Pri drugem poskusu znakov odmiranja ni bilo, nekroze so bile manjše. Iz naših rezultatov lahko sklepamo, da vzroka za manjšo dovzetnost *F. ornus* za okužbo z glivo *C. fraxinea*, ni v določenih snoveh ki jih vsebuje les *F. ornus*, temveč nekje drugje. Morda gliva ni sposobna okužiti listov malega jesena in zaradi tega ne more prodreti do poganjka in na njem povzročiti bolezen. Vendar tudi ta sklep ovržejo ugotovitve, do katerih sta prišla Kräutler in Kirisits (2011). Dokazala sta, da je za simptome uvelega listja na jesenu kriv

teleomorf glive *C. fraxinea* – *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. V poskusu inokulacije glive *H. pseudoalbidus* na liste dreves sta preučevala odziv 3 vrst jesenov (*F. excelsior*, *F. angustifolia*, *F. ornus*). Simptomi bolezni (nekroze na listnih pecljih, venenje, odpadanje) so se pojavili na listih vseh 3 vrst jesenov, torej vključno s *F. ornus*.

Hitro rast smo opazili tudi na agarju z bukvijo (2,63 mm/dan). V naravi bolezen jesenov ožig sicer ne kuži bukke, agar z bukvijo pa smo v poskus vključili zato, ker je bukev pri nas skoraj najpogostejša vrsta. Hitrost rasti na agarju z velikim jesenom in na krompirjevem agarju je bila skoraj enaka, na agarju z velikim jesenom (2,34 mm/dan) nekoliko nižja kot na krompirjevem agarju (2,41 mm/dan).

Najhitrejšo rast smo torej opazili na gojiščih, ki smo jih pripravili iz žaganja izbranih dreves (mali jesen, veliki jesen, bukev) in na krompirjevem agarju. Vzrok k temu bi lahko bile višje koncentracije hranilnih snovi v teh gojiščih ali ustrežnejše koncentracije hranilnih snovi ali za glivo ustrezna razmerja med njimi. Med vsemi tremi gojišči, pripravljenimi iz žaganja dreves, tudi ni bilo statistično značilnih razlik.

Na vodnem agarju, ki smo ga pripravili samo z destilirano vodo in agarjem in v katerem je bilo hranil manj, je gliva rasla počasneje (1,51 mm/dan) ter v istem hitrostnem »rangu« kot na sladnem agarju (1,52 mm/dan) in na sladnem agarju (1,39 mm/dan) z dodatkom streptomycin sulfata. Hitrosti rasti na teh treh gojiščih se med seboj statistično niso razlikovale. Počasno rast na sladnem agarju je omenil že Kowalski (Kowalski, 2006).

Zanimivo je, da nismo odkrili statistično značilnih razlik v hitrosti rasti glive na sladnem agarju in sladnem agarju z dodanim fungicidom streptomycin sulfatom. Povprečna hitrost je bila na slednjem gojišču le nekoliko (0,03 mm/dan) nižja kot na sladnem agarju brez fungicida.

Najslabše je gliva rasla na Czapek agarju. Povprečna hitrost rasti je tukaj znašala 0,16 mm/dan, omeniti pa je treba, da večina izolatov pravzaprav sploh ni začela rasti. Hitrost rasti se je tukaj statistično značilno razlikovala od rasti na vseh ostalih gojiščih.

Izolate smo nato razdelili na poljske in slovenske ter preizkušali, ali se statistično razlikujejo v hitrosti rasti na vsakem od gojišč posebej. Ugotovili smo, da na večini gojišč ni statistično značilnih razlik v rasti med poljskimi in slovenskimi izolati glive *C. fraxinea*. Razlike smo ugotovili na sladnem agarju, na bukovem agarju in na Czapek agarju.

Hitrost rasti slovenskih izolatov je bila v povprečju hitrejša od poljskih. Višja hitrost rasti je bila zabeležena na vseh gojiščih, razen na krompirjevem agarju in na vodnem agarju. Na omenjenih dveh gojiščih so poljski izolati rasli hitreje kot slovenski. V literaturi lahko zasledimo, da so razlike v hitrosti med izolati z različnih območji in tudi med izolati znotraj istega območja (Kowalski in Bartnik, 2010). Razlike med poljskimi in slovenskimi izolati si delno lahko razlagamo s tem, da so bili 4 od 6 slovenskih izolatov izolirani že v letih 2007 in 2008, vsi ostali izolati pa so bili izolirani v letu 2010. Bolj natančno obravnavamo mogoče vzroke v naslednjem poglavju, kjer primerjamo vse izolate na sladnem agarju.

5.1.2 Razlike v rasti med izolati na sladnem agarju

Velikosti premerov izolatov glivnih kolonij *Chalara fraxinea* iz našega poskusa so merile od 6,50 mm do 48,33 mm. Če obravnavamo ločeno poljske in slovenske izolate, potem so premeri pri poljskih izolatih merili od 6,50 mm do 18,50 mm, pri slovenskih izolatih pa je razpon večji, in sicer od 6,83 mm do 48,33 mm. Kowalski navaja (Kowalski, 2006), da je velikost premera glivnih kolonij na sladnem agarju po treh tednih (21 dni) rasti pri temperaturi 20 °C in v temi znašala od 9 do 28 mm. V omenjenem članku nismo zasledili, da bi od premera kolonije odšteli tudi premer samega vcepka kot smo to storili mi, zato je treba pri primerjavi rezultatov Kowalskega z našimi vsem našim vrednostim prišteti premer vcepka 6 mm. Razpon premerov poljskih izolatov (9–28 mm), ki jih navaja Kowalski, tako dokaj sovпада z našimi rezultati premerov poljskih izolatov (12,50–24,50 mm, brez vcepka 6,5–18,50 mm). Razpon premerov slovenskih izolatov pa je večji (12,83–54,33 mm, brez vcepka 6,83–48,33 mm). Vzrok za visoko zgornjo mejo intervala sta izolata NEGL in RIBW s premeroma 50,33 mm (brez vcepka 44,33 mm) in 46,33 mm (48,33 mm). Velik premer imata tudi izolata KRW – 30,67 mm (brez vcepka 24,67 mm) in SBW – 29,50 mm (brez vcepka 23,50 mm). Preostala slovenska izolata imata manjše

premere MUTW – 24,17 mm (brez vcepka 16,17 mm) in KAM – 12,83 mm (brez vcepka 6,83 mm.)

Vzrok za takšne razlike v premerih bi lahko bil čas izolacije izolatov. Iz podatkov o izolatih v preglednici 1 je razvidno, da so bili vsi poljski izolati izolirani med 5. 8 in 22. 9 leta 2010. Slovenski izolati pa so bili, razen MUTW in KAM, izolirani že leta 2007 (NEGL, RIBW, SBW) in 2008 (KRW). Izolat MUTW je bil izoliran 24. 9. 2010, KAM pa 4. 11. istega leta. Veliki premeri izolatov NEGL in RIBW po 21 dneh rasti na sladnem agarju bi lahko bili posledica relativne starosti samih izolatov, ki so se spremenili zaradi razmer *in vitro*. S podaljševanjem časa shranjevanja žive glivne kulture v čisti kulturi se namreč v razmerah *in vitro* lahko pojavijo degeneracije (Kowalski in Holdenrieder, 2009a).

Ob vseh teh primerjavah naših rezultatov z rezultati Kowalskega moramo omeniti tudi podatek, da so naše glive rasle v inkubatorju pri temperaturi 22 °C, glive v poljskem poskusu pa pri 20 °C. Kot optimalna temperatura za rast večine izolatov glive se navaja temperatura okoli 20 °C, pri temperaturi 25 °C pa so zabeležili nekoliko počasnejšo rast (Kowalski in Bartnik, 2010). Poskusi v Laboratoriju za varstvo gozdov GIS so pokazali, da je hitrost rasti glive *C. fraxinea* največja pri 22 °C (Hauptman, 2011).

Podatek o hitrosti rasti na sladnem agarju navajata tudi Halmschlager in Kirisits (Halmschlager in Kirisits, 2008). Avstrijski izolati glive *C. fraxinea* so bili večinoma počasi rastoči, kar pomeni, da so v 3 do 8 tednih prerasli petrijevke premera 5 cm, pri temperaturi 23–25 °C. Preračunano v hitrost znaša to od 0,89 mm/dan do 2,38 mm/dan, kar je primerljivo z našimi rezultati (0,46 mm/dan do 2,7 mm/dan).

V raziskavi o morfologiji kolonij različnih poljskih izolatov glive *C. fraxinea* in vplivih temperature na rast in strukturo kolonij (Kowalski in Bartnik, 2010) so omenjene velikosti premerov glive *C. fraxinea* po 5 tednih rasti na sladnem agarju pri temperaturi 20 °C med 33,5 mm/dan in 68,2 mm/dan. Preračunano v hitrost rasti znaša to od 0,96 mm/dan do 1,95 mm/dan, kar je primerljivo s hitrostmi izolatov iz našega poskusa. Hitrosti poljskih

izolatov iz našega poskusa so bile med 0,87 mm/dan in 2,10 mm/dan, hitrosti slovenskih pa med 0,46 mm/dan in 2,78 mm/dan.

Predmet naše raziskave sicer ni bilo opazovanje morfoloških razlik med kolonijami različnih izolatov glive *C. fraxinea*, a vseeno lahko omenimo, da smo morfološke razlike opazili tako na sladnem agarju kot na ostalih gojiščih. Opazili smo vse tri morfološke tipe, ki jih opisujeta Kowalski in Bartnik (Kowalski in Bartnik, 2010). Prav tako so nekateri izolati tvorili sektorje, ki so se razlikovali po barvi, strukturi micelija in hitrosti rasti. Na Czapek agarju smo pri izolatu KRW okoli vcepka opazili temno rjave hife značilnih oblik, ki so se razlikovale od oblik kolonije vseh ostalih izolatov na vseh ostalih gojiščih.

5.1.3 Razlike v rasti med izolati na različnih gojiščih

Opazili smo, da nekateri izolati rastejo hitreje od ostalih, vendar to pravilo ne velja na vseh gojiščih. Tako bi težko izpostavili izolat, ki je izražal najhitrejšo rast na vseh gojiščih. Na agarjih z bukvijo, malim jesenom in velikim jesenom je najhitreje rasel izolat SBW. Prav tako je največ in najhitreje zrasel na Czapek agarju. Na krompirjevem agarju in na sladnem agarju s streptomycin sulfatom je najhitreje rasel izolat P4478, na sladnem agarju izolat RIBW in na vodnem agarju izolat P4007.

Če razdelimo izolate glede na državo izvora, je samo med poljskimi izolati dokaj hitro rasel izolat P4478. Najhitrejšo povprečno hitrost rasti med poljskimi izolati je imel na vseh gojiščih razen na vodnem agarju, kjer je bil počasnejši od treh poljskih izolatov. Na agarju z velikim jesenom je bila njegova hitrost le malo višja od hitrosti izolata P4007. Pri slovenskih izolatih pa je najhitreje rasel izolat SBW. Njegova povprečna hitrost rasti je bila največja na vseh gojiščih, razen na vodnem in sladnem agarju. Na sladnem agarju je imel večjo hitrost izolat RIBW, na vodnem pa izolata RIBW in NEGL.

Pri najnižji hitrosti rasti izolatov je variabilnost še večja. Na krompirjevem agarju, vodnem agarju in na agarju z malim jesenom je imel najmanjšo hitrost izolat MUTW. Na agarju z velikim jesenom in na sladnem agarju s streptomycin sulfatom je najpočasneje rasel izolat P4482, na sladnem agarju izolat KAM, na agarju z bukvijo P4252. Na Czapek agarju, ki se

je izkazal za gojišče, ki najbolj zavira rast, ni kazal popolnoma nobenih znakov rasti izolat P4007, ki sicer ni rasel najpočasneje na ostalih gojiščih. Na vodnem agarju je ta izolat rasel najhitreje od vseh.

Razlike v hitrosti rasti izolatov so bile na vseh gojiščih, razen na vodnem agarju, statistično značilne. Med različnimi populacijami glive *Chalara fraxinea* tako obstajajo razlike, katerih vzrok bi morda lahko pojasnili z molekularnimi raziskavami.

Na vseh gojiščih smo dobili vsaj en izolat, pri katerem je bila variabilnost že med posameznimi ponovitvami velika. Vzrok za variabilnost med samimi ponovitvami pri istih izolatih je lahko tudi poškodovanost vcepkov zaradi precepljanja, premalo aktivnega micelija na vcepku in ostalih poškodb vcepka, ki se kljub pazljivosti lahko zgodijo med precepljanjem. Za natančnejše rezultate bi morali zasnovati poskus z več ponovitvami in ne samo s tremi, kot so bile v našem primeru.

5.2 SKLEPI

Na rast izoliranih kultur vplivajo lastnosti gojišča. Na gojiščih, ki vsebujejo večje oziroma ustrežnejše količine hranil, je rast hitrejša. Najhitrejšo rast smo opazili na agarju z malim jesenom (*Fraxinus ornus*), zato iz tega lahko sklepamo, da vzrok za manjšo dovzetnost malega jesena za okužbo z glivo ni v določenih snoveh, ki jih vsebuje les malega jesena, temveč nekje drugje. Če bi hoteli ugotoviti, kaj povzroča odpornost malega jesena, bi bilo potrebno uporabiti drugačne raziskovalne metode. Zgolj gojenje izolatov glive na gojiščih, pripravljenih iz izvlečkov lesa, ne pove veliko o dovzetnosti drevesne vrste za okužbe z glivo, saj kljub temu, da je gliva hitro rasla tudi na agarju z bukvijo, to še ne pomeni, da je bukev lahko potencialno ogrožena drevesna vrsta. Več smiselnih zaključkov bi verjetno lahko naredili, če bi na izbranih drevesnih vrstah izvajali poskuse z inokulacijo glive.

Med hitrostjo rasti poljskih in slovenskih izolatov na sladnem agarju so statistično značilne razlike. Povprečna hitrost rasti slovenskih izolatov je bila tudi večja. Sklepamo, da je eden od vzrokov za to neusklajena starost izolatov. S starostjo izolatov lahko pride do prilagoditve glive na laboratorijske pogoje (rast na gojišču v petrijevki, v temi in pri

določeni temperaturi), zato je treba v poskusih, kjer primerjamo med sabo različne izolate, za pridobitev dobrih rezultatov uporabiti približno enako stare izolate.

Da bi dobili boljše rezultate, na katere bi manj vplival negativni vpliv poškodb micelija v postopku precepljanja, bi bilo potrebno v poskus vključiti več ponovitev. Ob tem se zavedamo, da bi to ob velikem številu gojišč in izolatov pomenilo tudi obsežnejši poskus in bolj zamudno delo.

Med različnimi izolati glive *Chalara fraxinea* je velika variabilnost. Razlike v rasti posameznih izolatov so statistično značilne na vseh gojiščih, razen na vodnem agarju.

Iz rezultatov dela lahko zaključimo, da zakonitosti v hitrosti rasti izolatov glive *C. fraxinea* na različnih gojiščih niso jasno definirane. Iz dobljenih rezultatov sicer lahko razberemo, kateri izolati rastejo najhitreje, in iz tega sklepamo na ustreznost teh gojišč za rast glive *C. fraxinea*.

Za popolnejši vpogled v ekološke in fiziološke značilnosti glive *C. fraxinea* bi bilo potrebno uporabiti različne raziskovalne metode, od molekularnih analiz do poskusov z inokulacijo glive. Z rezultati gojenja glive *in vitro* si ne moremo vedno popolnoma razlagati njene biologije *in vivo*.

6 POVZETEK

Gliva *Chalara fraxinea* je povzročiteljica resne bolezni jesenovega ožiga, s katero se v zadnjih dvajsetih letih spopadajo na območju Evrope. Bolezen močno prizadene veliki jesen (*Fraxinus excelsior*) in ozkolistni jesen (*Fraxinus angustifolia*), mali jesen (*Fraxinus ornus*) pa v naravnih sestojih ni prizadet, zato se predvideva, da je odporen na bolezen. Ogroženi so jeseni vseh starosti. Simptomi jesenovega ožiga so venenje listov in sušenje poganjkov, odmiranje vej odraslih dreves, vzdolžne rjavkaste nekroze in raki na okuženih poganjkih. Z opazovanjem glive *in vitro* lahko sklepamo na njeno obnašanje in ekološke ter fiziološke značilnosti *in vivo*. Gojenje glive *C. fraxinea* na sladnem agarju je pokazalo razlike v barvi in morfologiji med glivnimi kolonijami posameznih izolatov, prav tako pa razlike v hitrosti rasti med posameznimi izolati. Ugotovili so tudi, da na rast kolonij glive *C. fraxinea* vpliva temperatura.

V diplomski nalogi smo ugotavljali razlike v rasti glivnih kolonij različnih izolatov *C. fraxinea*, primerjali izsledke z že znanimi podatki iz literature in opazovali rast glive *C. fraxinea* na 8 različnih gojiščih. Praktični del diplome je potekal na Oddelku za varstvo gozdov, Gozdarskega inštituta Slovenije. Začeli smo konec novembra 2010 s pripravo gojišč in različnih izolatov. Zastavili smo poskus z 12 različnimi izolati na 8 gojiščih v 3 ponovitvah. 6 izolatov nam je za potrebe raziskave iz Poljske poslal prof. Tadeusz Kowalski. Rast izolatov smo spremljali 8 tednov (od 10. 1. 2011 do 21. 3. 2011). Meritve premerov smo izvajali trikrat tedensko in na koncu iz dobljenih podatkov izračunali hitrosti rasti posameznih izolatov in naredili statistično analizo, pri kateri smo uporabili enosmerno analizo variance, ali pa neparametrični Kruskal-Wallisov test za enosmerno analizo variance. Poleg tega poskusa smo naredili tudi izolacije gliv iz sestoja velikega jesena (*Fraxinus excelsior*) z znaki jesenovega ožiga v okolici Kamnika. Ugotovili smo, da je bila izolirana gliva res *C. fraxinea*.

Hitrosti rasti glive so se razlikovale glede na gojišče, med gojišči so bile statistično značilne razlike. Najhitrejšo rast smo opazili na gojiščih, ki smo jih pripravili iz žaganja izbranih dreves (mali jesen, veliki jesen, bukev) in na krompirjevem agarju. To je verjetno posledica višjih koncentracij hranilnih snovi v teh gojiščih, ustrežnejše koncentracije

hranilnih snovi, ali pa boljših razmerij med njimi. Gojenje izolatov glive na gojiščih, pripravljenih iz izvlečkov lesa, ne pove veliko o dovzetnosti drevesne vrste za okužbe z glivo, saj je gliva najhitreje rasla na agarju z malim jesenom, ki v naravi ni dovzeten za okužbe z glivo. Iz tega lahko sklepamo, da je vzrok za odpornost drugje. Na Czapek agarju je bila rast gliv zaradi snovi, ki jih vsebuje gojišče, pri vseh izolatih zelo ovirana. Slovenski izolati so skoraj na vseh gojiščih rasli hitreje kot poljski, kar je bila verjetno posledica tega, da je bilo 4 od 6 slovenskih izolatov starejših od ostalih izolatov. Da ne bi prihajalo do takšnih posledic, bi bilo v poskus treba vključiti predvsem sveže izolate enakih starosti. Razlike v rasti med posameznimi izolati glive *C. fraxinea* so bile statistično značilne na vseh gojiščih, razen na vodnem agarju. Natančne zakonitosti v hitrosti rasti izolatov glive *C. fraxinea* na različnih gojiščih niso jasno definirane, lahko pa iz hitrosti večine izolatov sklepamo na ustreznost gojišča za glivo *C. fraxinea*. Za popolnejše razumevanje biologije te patogene glive bi bila potrebna nadaljnja raziskovanja in različne raziskovalne metode.

7 VIRI

Bakys R., Vasaitis R., Barklund P., Thomsen I. M., Stenlid J. 2009. 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

Brus R. 2004. Drevesne vrste na Slovenskem. Ljubljana, Mladinska knjiga: 399 str.

European and Mediterranean Plant Protection Organization (2011)

<http://www.eppo.org/> (21. 8. 2011)

Halmschlager E., Kirisits T. 2008. First report of the ash dieback pathogen *Chalara fraxinea* on *Fraxinus excelsior* in Austria. New Disease Reports. 17, 20

<http://www.ndrs.org.uk/article.php?file=2008-25.asp> (21. 8. 2011)

Hauptman T. 2011. »Vpliv temperature na rast glive *Chalara fraxinea*« Ljubljana, Gozdarski inštitut Slovenije, Oddelek za varstvo gozdov (osebni vir, junij 2011)

Hauptman T., Ogris N., Jurc D. 2010. Kaj se dogaja z jesenom pri nas? - Tretje nadaljevanje. Gozdarski vestnik, 68, 2: 71-73

Jankovsky L., Holdenrieder O. 2009. *Chalara fraxinea* – Ash Dieback in the Czech Republic. Plant Protection Science, 45: 74-78

Jurc D. 2009. Kaj se dogaja z jesenom pri nas? - Prvo nadaljevanje. Gozdarski vestnik, 67, 2: 67-68

Kirisits T., Cech T. L. 2011. Alien Pathogens of Forest Trees in Austria.V: IUFRO 2011 WP 7.02.02 Global Change and Forest Diseases: New Threats, New Strategies, Montesclaros Monastery, Cantabria, Spain, 23-28 May 2011. Diez J. J., Martínez-Álvarez P., Romeralo C. (ur.). Universidad de Valladolid: 96

- Kirisits T., Matlakova M., Mottinger-Kroupa S., Cech T. L., Halmschlager E., 2009a. The current situation of ash dieback caused by *Chalara fraxinea* in Austria. V: Proceedings of the conference of IUFRO working party 7.02.02, Eğirdir, Turkey, 11.–16. May 2009. SDU Faculty of Forestry Journal. Doğmuş Lehtijärvi T.H. Isparta, Turkey, Süleyman Demirel University: Special edition: 97-119
- Kirisits T., Matlakova M., Mottinger-Kroupa S., Halmschlager E. 2008. Involvement of *Chalara fraxinea* in Ash Dieback in Austria. Forstschutz Aktuell, 44: 16-18
- Kiristis T., Matlakova M., Mottinger-Kroupa S., Halmschlager E., Lakatos F. 2009b. *Chalara fraxinea* associated with dieback on narrow-leaved ash (*Fraxinus angustifolia*). New Disease Reports. 19, 43.
<http://www.ndrs.org.uk/article.php?id=019043> (21. 8. 2011)
- Kowalski T. 2006. *Chalara fraxinea* sp. nov. associated with dieback of ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland. Forest Pathology, 36, 4: 264-270
<http://dx.doi.org/doi:10.1111/j.1439-0329.2006.00453.x> (20. 8. 2011)
- Kowalski T., Holdenrieder O. 2009a. Pathogenicity of *Chalara fraxinea*. Forest Pathology, 39, 1: 1-7
<http://dx.doi.org/doi:10.1111/j.1439-0329.2008.00565.x> (20. 8. 2011)
- Kowalski T., Holdenrieder O. 2009b. The teleomorph of *Chalara fraxinea*, the casual agent of ash dieback. Forest pathology, 39, 5: 304-308
<http://dx.doi.org/doi:10.1111/j.1439-0329.2008.00589.x> (20. 8. 2011)
- Kowalski T., Bartnik C. 2010. Morphological variation in colonies of *Chalara fraxinea* isolated from ash (*Fraxinus excelsior* L.) stems with symptoms of dieback and effects of temperature on colony growth and structure. Acta agrobotanica, 63, 1: 99-106

Kräutler K., Kirisits T. 2011. The Ash Dieback Pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus* is associated with Leaf Symptoms on Ash Species (*Fraxinus* spp.). V: IUFRO 2011 WP 7.02.02 Global Change and Forest Diseases: New Threats, New Strategies, Montesclaros Monastery, Cantabria, Spain, 23-28 May 2011. Diez J. J., Martínez-Álvarez P., Romeralo C., Universidad de Valladolid: 102

Muller G.M. (ur.), Bills G. F. (ur.), Foster M. S.(ur.). 2004. Biodiversity of Fungi, Inventory and Monitoring methods. Amsterdam Elsevier Academic Press: 672 str.

Ogris N. 2008. Jesenov ožig, *Chalara fraxinea*. Novice iz varstva gozdov, 1: 1-1
<http://www.zdravgozd.si/nvg/prispevek.aspx?idzapis=1-1> (27. 8. 2011)

Ogris N. 2009. Kaj se dogaja z jesenom pri nas? - Drugo nadaljevanje. Gozdarski vestnik, 67, 5/6: 251-252

Ogris N., Hauptman T., Jurc D. 2009. *Chalara fraxinea* causing common ash dieback newly reported in Slovenia. Plant Pathology, 58, 1173.
<http://dx.doi.org/doi:10.1111/j.1365-3059.2009.02105.x> (20. 8. 2011)

Piškur B. 2010. Kaj se dogaja z jesenom pri nas? - Četrto nadaljevanje. Gozdarski vestnik, 68, 5/6: 340-345

Queloz V., Grünig C., R, Berndt R., Kowalski T., Sieber T. N., Holdenrieder O. 2010. Cryptic speciation in *Hymenoscyphus albidus*. Forest pathology
<http://dx.doi.org/doi:10.1111/j.1439-0329.2010.00645.x> (20. 8. 2011)

Timmermann V., Borja I., Hietala A. M., Kirisits T., Solheim H. 2011. Ash dieback: pathogen spread and diurnal patterns of ascospore dispersal, with special emphasis on Norway. EPPO Bulletin, 41, 1: 14-20
<http://dx.doi.org/doi:10.1111/j.1365-2338.2010.02429.x> (25. 8. 2011)

ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr. Dušanu Jurcu za mentorstvo, prijaznost, zanesljivost in strokovne opombe.

Zahvaljujem se tudi recenzentu doc. dr. Robertu Brusu za hiter pregled diplomskega dela.

Tinetu Hauptmanu se zahvaljujem za pomoč pri zbiranju literature, za pomoč in nasvete pri praktičnem delu in obdelavi podatkov ter za ves čas, ki mi ga je posvetil.

Zini Devetak se zahvaljujem za pomoč in nasvete pri laboratorijskem delu.

Rada bi se zahvalila tudi očetu, mami in bratu, ker so me vzpodbujali in ker se na njih lahko vedno zanesem. Najlepša hvala tudi Nestiju, za nasvete in podporo ter za vse ostalo.

In hvala Galu. Za vse.

PRILOGE

PRILOGA A: Hitrost rasti glivnih kolonij 12 različnih izolatov glive *Chalara fraxinea* na 8 različnih gojiščih (mm/dan) in standardni odklon

Hitrost rasti na posameznih gojiščih (mm/dan)																
Izolati	MEA		BUKEV		PDA		M.JESEN		V.JESEN		MEA+ss		CZAPEK		VODNI	
P4035	0,87*	±0,11**	2,45	±0,25	1,64	±0,77	2,51	±0,12	2,53	±0,32	0,48	±0,02	0,12	±0,04	1,92	±0,6
P4482	1,00	±0,04	2,22	±0,31	1,73	±0,40	2,40	±0,18	1,54	±0,25	0,48	±0,01	0,03	±0,05	1,03	±0,34
P4252	0,90	±0,08	1,67	±0,55	3,35	±0,35	3,07	±1,44	1,63	±0,20	0,72	±0,24	0,11	±0,09	1,14	±1,01
P4478	2,07	±0,36	2,75	±0,23	4,35	±0,23	4,50	0,00	2,80	±0,10	3,49	±0,15	0,17	±0,17	1,31	±0,22
P4007	1,05	±0,02	2,34	±0,05	3,05	±0,49	3,36	±0,04	2,79	±0,16	1,35	±0,31	0,00	0,00	2,70	±0,21
P4253	0,98	±0,02	2,27	±0,05	2,41	±0,47	4,42	±0,11	1,89	±0,12	1,40	±0,26	0,09	±0,05	1,53	±0,16
NEGL	2,46	±0,02	2,21	±0,01	2,58	±0,24	3,71	±0,17	2,51	±0,04	1,76	±0,07	0,34	±0,21	1,83	±0,01
RIBW	2,79	±0,07	3,43	±0,20	1,26	±0,04	3,85	±1,08	2,68	±0,07	1,39	±0,16	0,13	±0,22	1,63	±0,28
KRW	1,84	±0,91	2,60	±0,02	2,12	±0,48	3,56	±0,09	2,29	±0,04	0,86	±0,16	0,35	±0,13	1,46	±0,25
MUTW	1,34	±0,64	2,83	±0,09	1,11	±0,16	2,39	±0,29	2,31	±0,46	1,36	±1,25	0,08	±0,09	0,92	±0,11
KAM	0,46	±0,13	2,48	±0,22	1,60	±0,17	2,95	±0,17	2,21	±0,15	0,94	±0,05	0,10	±0,09	1,16	±0,91
SBW	2,46	±0,97	4,36	±0,16	3,76	±0,73	5,33	0,00	2,94	±0,05	2,47	±0,35	0,42	±0,14	1,46	±0,65
SKUPAJ	1,52	±0,83	2,63	±0,70	2,41	±1,06	3,50	±1,00	2,34	±0,48	1,39	±0,91	0,16	±0,17	1,51	±0,63

** standardni odklon

* hitrost rasti

PRILOGA B: Rezultati Kruskal-Wallisovega testa pri primerjavi hitrosti rasti posameznih izolatov glive *C. fraxinea* na različnih gojiščih. Ničelna hipoteza je, da ni statistično značilnih razlik med hitrostjo rasti izolatov pri stopnji značilnosti $\alpha = 0,05$

Šifra gojišča	Testna statistika	p	Odločitev
MEA	30,6199	0,0013	So statistično značilne razlike
BUKEV	29,1915	0,0021	So statistično značilne razlike
PDA	29,1915	0,0021	So statistično značilne razlike
M.JESEN	29,1110	0,0022	So statistično značilne razlike
V.JESEN	29,7061	0,0018	So statistično značilne razlike
MEA+ss	28,7409	0,0025	So statistično značilne razlike
CZAPEK	21,3502	0,0299	So statistično značilne razlike
VODNI	17,8246	0,0857	Ni statistično značilnih razlik