

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

Manca VRHOVNIK

**INOKULACIJA SEJANK OBMORSKEGA BORA
(*Pinus pinaster*) Z GLIVO *Fusarium circinatum* PO
TRETIRANJU Z METIL JASMONATOM**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

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

Manca VRHOVNIK

**INOKULACIJA SEJANK OBMORSKEGA BORA (*Pinus pinaster*) Z
GLIVO *Fusarium circinatum* PO TRETIRANJU Z METIL
JASMONATOM**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**INOCULATION OF MARITIME PINE (*Pinus pinaster*) SEEDLINGS
WITH THE FUNGUS *Fusarium circinatum* AFTER METHYL
JASMONATE TREATMENT**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija gozdarstva. Praktični del naloge je bil opravljen v Španiji, na Univerzi Extremadura, na Oddelek za gozdarski inženiring v Plasenciji (Ingeniería Técnica Forestal especialidad en Explotaciones Forestales, Plasencia), v okviru Erasmus izmenjave študentov. Zaključek diplomskega dela je potekal v Sloveniji, v Ljubljani, na Gozdarskem inštitutu Slovenije.

Študijska komisija Oddelka za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire je dne, 24. 3. 2010 sprejela temo in naslov naloge. Za mentorja diplomskega dela je bil imenovan doc. dr. Dušan Jurc, za somentorja prof. dr. Alejandro Solla Hach ter za recenzentko prof. dr. Maja Ravnikar.

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 Biotehnične fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Manca Vrhovnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	GDK 443:174.7 <i>Pinus pinaster</i> :232.41--010(043.2)=163.6
KG	<i>Gibberella circinata/Fusarium subglutinans</i> f. sp. <i>pini</i> /borov smolasti rak/jasmonska kislina/hormon/hranilni elementi/NPK/odpornost sejank/travmatski smolni kanali
AV	VRHOVNIK, Manca
SA	JURC, Dušan (mentor)/SOLLA HACH, Alejandro (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 83
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire
LI	2010
IN	INOKULACIJA SEJANK OBMORSKEGA BORA (<i>Pinus pinaster</i>) Z GLIVO <i>Fusarium circinatum</i> PO TRETIRANJU Z METIL JASMONATOM
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII, 76 str., 3 pregl., 53 sl., 3 pril., 98 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Z eksogeno aplikacijo hormona metilnega estra jasmonske kisline (MJ) je bil proučevan vpliv na odpornost sejank obmorskega bora (<i>Pinus pinaster</i>) proti patogeni glivi <i>Fusarium circinatum</i> . Ugotavljal se je tudi pomen različnih koncentracij NPK (dušik, fosfor, kalij) gnojil za rast in razvoj sejank ter vpliv posameznih hranilnih elementov na odpornost sejank proti patogeni glivi. Bolezen borov smolasti rak je karantenska bolezen, ki kuži vse vrste borov, zlasti v drevesnicah in nasadih. Poskus je bil opravljen na 3 mesece starih sejankah <i>Pinus pinaster</i> . Sejanke so bile razdeljene v 4 bloke ter znotraj blokov v 9 skupin, z različnimi koncentracijami NPK gnojila. Dva bloka sejank (III in IV) sta bila najprej tretirana s 25 mM MJ, nato pa skozi rane okužena s patogeno glivo. Simptomi razvoja bolezni so bili opazovani 8 tednov. MJ je imel negativen vpliv na rast apikalnih meristemov in ni vplival na večjo odpornost sejank, smrtnost je bila celo večja kot pri netretiranih sejankah. Vzrok je lahko v toksičnem delovanju MJ. Razlike v količini travmatskih smolnih kanalov med tretiranimi in netretiranimi sejankami ni bilo zaznati. Višje koncentracije gnojil v substratu vplivajo na hitrešo in bujnejšo rast sejank. Dodani dušik je vplival na večjo občutljivost sejank za bolezen. Fosfor je povzročil močnejšo rast koreninskega sistema. Pri preučevanju vpliva kalija na sejanke, specifičnih sprememb nismo opazili.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN GTh
DC FDC 443:174.7 *Pinus pinaster*:232.41--010(043.2)=163.6
CX *Gibberella circinata/Fusarium subglutinans* f. sp. *pini*/pitch canker/jasmonic acid/hormon/nutrients/fertilization/resistance of seedlings/traumatic resin duct
AU VRHOVNIK, Manca
AA JURC, Dušan (supervisor)/SOLLA HACH, Alejandro (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 83
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of forestry and renewable forest resources
PY 2010
TI INOCULATION OF MARITIME PINE (*Pinus pinaster*) SEEDLINGS WITH THE FUNGUS *Fusarium circinatum* AFTER METHYL JASMONATE TREATMENT
DT Graduation thesis (University studies)
NO XII, 76 p., 2 tab., 53 fig., 3 ann., 98 ref.
LA sl
AL sl/en
AB
Influence on the resistance toward the pathogen fungus *Fusarium circinatum* after exogenous application of methyl jasmonate (MJ) on seedlings of maritime pine (*Pinus pinaster*) was investigated. The impact of different concentrations of NPK (nitrogen, phosphorus, potassium) fertilizers on the growth and development of seedlings and consequently the effects of particular nutrients on the seedling resistance against the fungus was also examined. Pitch canker is a quarantine disease that can affect all species of pine, especially in nurseries and plantations. The experiment was performed on 3 months old seedlings of *P. pinaster*. The seedlings were divided into 4 blocks; each of them consisted of 9 groups with different NPK treatments. Seedlings in two blocks (III and IV) were treated with 25 mM of MJ. A day later, they were infected through wounds with *F. circinatum*. The symptoms were monitored for 8 weeks. We have observed that MJ had no effect on better resistance; the mortality was even higher than in untreated seedlings. MJ had a negative influence on the growth of apical meristems. Possible cause could be the toxicity of MJ. There was no difference in the number of traumatic resin ducts between treated and untreated seedlings. Large concentrations of fertilizer in the substrate provoked the seedlings to grow faster and bigger, albeit lowering the resistance toward the fungus. The treatment with nitrogen especially lowered the plant resistance. Phosphorus caused stronger growth of the seedlings root system. No specific change was observed after treatment of plants with potassium.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
1 UVOD	1
1.2 OPREDELITEV PROBLEMA	1
2 PREGLED OBJAV	5
2.1 <i>Fusarium circinatum</i> NIRENBERG & O'DONNELL	5
2.1.1 Sistematika	5
2.1.2 Gostitelj	7
2.1.3 Geografska razširjenost vrste	7
2.1.4 Biologija patogena	9
2.1.5 Detekcija in determinacija	9
2.1.6 Prenašalci bolezni	12
2.1.7 Morfologija	13
2.1.8 Ekonomski in varstveni problem	16
2.1.9 Kontrola	17
2.2 <i>Pinus pinaster</i> AIT	18
2.3.1 Jasmonati	21
2.3.2 Funkcija metil jasmonata in jasmonske kisline v rastlini	22
2.3.2.1 Oktadekanoidna signalna pot in biosinteza jasmonske kisline	23
2.3.2.2 Lokalni in sistemski odziv rastlin na ranitev	24
2.4 HRANILNI ELEMENTI IN NJIHOV FIZIOLOŠKI POMEN PRI RASTLINAH	26
3 METODA DELA	29
3.1 PRIPRAVA SUBSTRATA IN VZGOJA SEJANK <i>Pinus pinaster</i> AIT	29
3.2 TRETIRANJE SEJANK Z METIL JASMONATOM TER INOKULACIJA SEJANK S PATOGENO GLIVO <i>Fusarium circinatum</i> NIRENBERG & O'DONNELL	32
3.3 SPREMLJANJE SIMPTOMOV RAZVOJA BOLEZNI	37
3.4 ANALIZA NEINOKULIRANIH SEJANK	37
4 REZULTATI	42
4.2 VPLIV NPK GNOJIL NA RAZVOJ SEJANK	42

4.2 VPLIV METIL JASMONATA NA ANATOMSKE SPREMEMBE V RASTLINI...	45
4.3 RAZVOJ SIMPTOMOV IN SMRTNOST SEJANK ZARADI <i>Fusarium circinatum</i> , GLEDE NA VSEBNOST NPK GNOJIL V SUBSTRATU TER TRETIRANJE Z METIL JASMONATOM	50
5 RAZPRAVA	57
5.1 VPLIV NPK GNOJIL NA RAZVOJ SEJANK <i>Pinus pinaster</i> TER ODPORNOST PROTI PATOGENI GLIVI <i>Fusarium circinatum</i>	57
5.2 VPLIV METIL JASMONATA NA RAZVOJ SEJANK <i>Pinus pinaster</i> TER ODPORNOST PROTI PATOGENI GLIVI <i>Fusarium circinatum</i>	59
5.2 MOŽNOSTI POJAVA KARANTENSKE GLIVE <i>Fusarium circinatum</i> V SLOVENIJI.....	61
6 ZAKLJUČKI	63
7 POVZETEK	65
8 VIRI	67
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Kemijski zapis jasmonske kisline in metil jasmonata.....	21
Preglednica 2: Tretiranje sejank <i>Pinus pinaster</i> s hranilnimi elementi. Prisotnost elementa je označena s +, odsotnost z -.....	32
Preglednica 3: Klasifikacija simptomov bolezni (Muñoz in Ampudia 2005)	37

KAZALO SLIK

Slika 1: Extremadura, Španija (Vir: Extremadura..., 2006).....	4
Slika 2: Nacionalni park Monfragüe, Extremadura (Vir: Monfragüe..., 2004).....	4
Slika 3: Širjenje glive <i>F. circinatum</i> in možnosti vnosa v Španijo (Vir: <i>Gibberella circinata</i> ..., 2006).....	8
Slika 4: Simptomi bolezni na odraslih drevesih. A) odmiranje vrhov okuženih dreves, B) povečana količina smole na okuženih vejah, C) povečana količina smole pod skorjo okužene veje, D) sporodohiji glive <i>F.circinatum</i> se nahajajo na brazgotinah, kjer so izraščale iglice (Vir: Barnard E. L. , Blakeslee G. M. 2006)	10
Slika 5: Značilno jantarno obarvan les kot posledica povečanega smolenja gostitelja, zaradi okužbe s patogeno glivo <i>F. circinatum</i> (Vir: Further outbreaks...2008)	10
Slika 6: Primer izgleda koreninskega sistema pri rodu <i>Pinus</i> , okuženega s <i>F. circinatum</i> A) v drevesnicah in B) v naravnem sestoju (Vir: Barnard E .L. , Blakeslee G. M. 2006).....	11
Slika 7: Primer okužbe sejank v drevesnicah (Vir: Barnard E. L. 2001)	11
Slika 8: Primer okužbe storžev (Vir: Barnard E. L. 2001).....	12
Slika 9: Prenašalci bolezni; A) <i>Pissodes nemorensis</i> Germar (Vir: Murray T. 2007), B) <i>Rhyacionia</i> spp. (Vir: Whinney N. 2010), C) <i>Dioryctria</i> spp. (Vir: Dioryctria...2009)	13
Slika 10: Mikrokonidiji (a) in makrokonidiji (b) (Vir: Leslie J.F. in Summerell B.A. 2006). 14	
Slika 11: A) Hifni zvitki s konidijofori, na katerih se nahajajo mikrokonidiji, B) skupina spiralasto zvitih hif in polifialidičnih konidioforov (Vir: EPPO Bulletin, 2009) ter C) hifni zvitki (Vir: Presence of..., 2006).....	15
Slika 12: Sterilni micelij glive vzgojen na PDA (Vir: 04 Fusa circi PDA..., 2007)	15
Slika 13: Razširjenost obmorskega bora (<i>Pinus pinaster</i> Ait.) (Vir: Distribution map...,2003).....	18
Slika 14: Primer storža in semen obmorskega bora (Vir: <i>Pinus pinaster</i> ..., 2007)	19
Slika 15: <i>Pinus pinaster</i> (njegov habitus) ter slika nasada z isto drevesno vrsto, Španija, Extremadura (foto: Vrhovnik M. , 2008).....	20
Slika 16: Molekularna zgradba jasmonske kisline (levo) in metil jasmonata (desno) (Vir: Jasmonic acid, 2009).....	21
Slika 17: A) Storž <i>Pinus pinaster</i> Ait. , vir semen ter B) dezinfekcija semen v 30% raztopini H ₂ O ₂ (foto: Vivaz M. 2007).....	29

Slika 18: Posode z razkuženim rastnim substratom (foto: Vivaz M. 2007)	30
Slika 19: Izgled sejank, predno so bile prenešene v rastlinjak (foto: Vivaz M. 2008)	31
Slika 20: Tri mesece stare sejanke <i>Pinus pinaster</i> , razdeljene v 10 skupin po 20 rastlin (foto: Vrhovnik M. 2008).....	31
Slika 21: Potek razvrščanja tri mesece starih sejank <i>Pinus pinaster</i> v 4 bloke (foto: Krajnc B. 2008).....	33
Slika 22: Tween® 20 in 95% metil jasmonat (foto: Vrhovnik M. 2008).....	33
Slika 23: Priprava čistih kultur glive <i>F. circinatum</i> v laboratoriju (foto: Vrhovnik M. 2008)	34
Slika 24: Primer ranitve sejanke (foto: Vrhovnik M. 2008).....	35
Slika 25: Postopek okužbe s patogeno glivo <i>F. circinatum</i> ; nanos micelija glive na rano (foto: Vrhovnik M. 2008).....	36
Slika 26: Merjenje posameznih delov sejank <i>P. pinaster</i> z digitalno tehnico (foto: Vrhovnik M. 2008)	38
Slika 27: Zgornji del steba, shranjen v fiksatorju FAA (foto: Vrhovnik M. 2008)	39
Slika 28: Priprava korenin za skeniranje (foto: Vrhovnik M. 2008).....	39
Slika 29: Primeri skeniranih korenin sejank <i>P. pinaster</i> (foto: Vrhovnik M. 2008).....	40
Slika 30: Primer papirnatih vrečk, v katerih smo sušili korenine <i>P. pinaster</i> (slika levo) ter korenine primerne za merjenje suhe mase snovi (slika desno) (foto: Vrhovnik M. 2008).....	40
Slika 31: Slika tkiva pridobljena na mikroskopu s fotoaparatom Canon (foto: Vrhovnik M. 2008)	41
Slika 32: Vpliv NPK skupin na višino sejanke	42
Slika 33: Delitev sejanke na dolžino A) zelenega dela ter dolžino B)steba (foto: Vrhovnik M. 2008)	43
Slika 34: Višina zelenega dela sejanke glede na fertilizacijske skupine	44
Slika 35: Vpliv fosforja na površino koreninskega sistema	44
Slika 36: Vizualna primerjava rastnih vršičkov netretiranih (slika levo) in tretiranih sejank z MJ (slika desno) (foto: Vrhovnik M. 2008).....	45
Slika 37: Vpliv metil jasmonata na končno višino sejank.....	46
Slika 38: Vpliv ranitve in metil jasmonata sejank na končno dolžino zelenega dela rastline.	47
Slika 39: Vpliv ranitve in metil jasmonata na maso zelenega dela sejanke	47
Slika 40: Vpliv ranitve in metil jasmonata na maso suhih korenin	48
Slika 41: Vpliv ranitve in metil jasmonata na površino plašča korenin (SA)	49

Slika 42: Izgled simptomov kategoriziranih po Muñoz in Ampudia, 2005 (foto: Vrhovnik M. 2008).....	50
Slika 43: Razvoj simptomov sejank v bloku III.....	51
Slika 44: Primer sejanke, ki so se ji pod mestom okužbe pričeli razvijati speči poganjki (foto: Vrhovnik M. 2008).....	51
Slika 45: Smrtnost sejank v bloku III po 8. tednu opazovanja	52
Slika 46: Razvoj simptomov na sejankah v bloku IV	52
Slika 47: Smrtnost sejank v bloku IV po 8.tednu opazovanja	54
Slika 48: Primerjava mortalitet bloka III in bloka IV	54
Slika 49: Smrtnost sejank glede na fertilizacijsko skupino. Fertilizacijske skupine so enake, le oznake so različne (C=K, T1=S1, T2=S2, T3=S3, T4=S4, T5=S5, T6=S6, T7=S7, T8=S8, T9=S) (Vir: Vivas in sod. 2009).....	55
Slika 50: Časovni razvoj simptomov tretiranih in netretiranih sejank	55
Slika 51: Razširjenost alepskega bora v Evropi (Vir: Distribution maps... 2003).....	61
Slika 52: Razširjenost črnega bora v Evropi (Vir: Distribution maps... 2003).....	62
Slika 53: Razširjenost pinije v Evropi (Vir: Distribution maps... 2003).....	62

SEZNAM PRILOG

PRILOGA A: Primer naključno izbranih prerezov stebelnega tkiva in okularna ocena števila smolnih kanalov

PRILOGA B: Primerjava koreninskega sistema tretiranih in netretiranih sejank (primer naključno izbranih sejank iz vsake fertilizacijske skupine)

PRILOGA C: Članek z naslovom: Fertilización de plántulas de *Pinus pinaster* y su efecto en la susceptibilidad a *Fusarium circinatum*

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AOC	alenoksid ciklaza
AOS	alenoksid sintaza
ADP	adenozin difosfat
ATP	adenozin trifosfat
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EPPO	European Plant Protection Organisation
FAA	Formalin-Acetic-Alcohol
IUPAC	Internetional Union of Pure and Applied Chemistry
JA	jasmonska kislina
LA	linolenska kislina
LOX	lipoksgenaza
MJ	metil jasmonat
NPK	dušik, fosfor, kalij
PA	projekcijska površina korenin
PPC	polifenolične parenhimske celice
PdA	fitodienojska kislina
PDA	krompirjev agar
RNA	ribonukleinska kislina
SA	površina plašča korenin
UV	ultravijolično sevanje
12-OH-JA12-	hidroksijasmonska kislina

1 UVOD

1.2 OPREDELITEV PROBLEMA

Borov smolasti rak, ki ga povzroča gliva *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell, je bolezen, ki prizadane veliko vrst borov, na različnih koncih sveta (Dwinell in sod. 1985, Viljoen in sod. 1994). Gliva povzroča poškodbe v več fazah razvoja dreves, tako v semenih, sejankah kot tudi na odraslih drevesih. Poleg smolastih rakavih ran med simptome bolezni štejemo tudi poleganje kalčkov v tleh ter gnitje korenin nekoliko starejših sadik. Simptomi bolezni pri sadikah niso specifični. Kažejo se kot nekroza skorje, rumenenje, smolenje in odmiranje iglic. Okužbe v koreninskem predelu povzročijo odebelitev koreninskega vratu, smolenje in sprijemanje korenin s prstjo, nekrozo skorje ter venenje in odmiranje iglic, kar vodi do propada rastline.

Pri starejših drevesih se na mestu okužbe pojavi nekroza skorje in močno smolenje. Rane se lahko pojavi na vejah, koreninah ali deblu. Zaradi močnega smolenja prihaja do motenj v pretoku vode. To povzroči venenje vrhov vej in rumenenje iglic, ki sčasoma postanejo rdečkaste in odmrejo. Če odstranimo skorjo na mestu okužbe, je les močno prepojen s smolo in značilno jantarno obarvan (barva medu). Tak les je z vidika lesnopredelovalne industrije neprimeren za pridobivanje kakovostnih sortimentov.

Prvič so glivo opisali že leta 1946 (Hepting in Roth) na severovzhodni obali ZDA. Nato se je širila tudi na zahodno obalo ZDA, kjer so leta 1948 glivo izolirali iz obolelega kalifornijskega bora (*Pinus radiata* D. Don.). Od takrat so bolezen zaznali na različnih vrstah bora v severovzhodnih ZDA, Japonski, Mehiki, Južni Afriki in Čilu. Leta 2005 (Landeras in sod.) se je bolezen pojavila v severni Španiji. To je prvo poročilo o izbruhu te bolezni v Evropi. Tu so okuženi predvsem *Pinus radiata*, *P. pinaster* in *P. sylvestris*.

V Sloveniji gliva še ni prisotna. Od 18. junija 2007 je uvrščena na karantensko listo, saj so jo istega leta zasledili v sosednji državi Italiji. Najverjetnejše je pojav glive povezan s transportom lesa. V Italiji so bolezen odkrili na posameznih alepskih borih in pinijah, rastočih v urbanem okolju. Leta 2007 so nad pojavom in širjenjem glive *F. circinatum*

ovedli obvezen nadzor. Podlaga za nadzor je Odločba komisije o začasnih nujnih ukrepih za preprečevanje vnosa glive *F. circinatum* Nirenberg & O'Donnell v Skupnost in njenega širjenaja v Skupnosti (2007/433/ES).

Posebni nadzor nad patogeno glivo obsega preglede in vzorčenja, pri katerih sodelujejo fitosanitarni inšpektorji, ki pregledujejo objekte za pridelovanje sadilnega materiala v okrasnih drevesnicah in vrtnih centrih ter uvozne pošiljke semen in sadik. Sodelavci Oddelka za varstvo rastlin na Kmetijskem inštitutu Slovenije opravljajo vzorčenja v parkih in na drugih javnih površinah ter vrtovih. Naloga Gozdarskega inštituta je pregledovanje gozdnih in okrasnih drevesnic, po potrebi in presoji preverjajo tudi gozdne sestoje.

Namen diplomske naloge je bilo ugotoviti ali lahko s primerno vrednostjo hranilnih elementov v substratu in hormonsko tretacijo vzgojimo sejanke, ki so za patogeno glivo manj dovzetne ali celo rezistentne.

Prva hipoteza poskusa je bila, da so rastline, ki so dodatno tretirane s sintetično pridobljenim metil jasmonatom, na glivo *F. circinatum* bolj odporne. Jasmonska kislina (JA) je snov, ki v rastlini sproži zaščito pred biotskimi in abiotskimi stresnimi dejavniki. Rastline JA in njen ester metil jasmonat (MJ) proizvajajo v stresnih stanjih (npr. napad patogenih dejavnikov). Delujejo kot signalne molekule, ki sprožijo proizvajanje fitoleksinov. Ti na patogene organizme delujejo toksično in preprečijo njihovo nadaljnjo razraščanje.

Druga hipoteza poskusa je, da so sejanke, ki rastejo v substratih z neprimerno količino gnojil, na glivo *F. circinatum* manj odporne. To razmišljanje izhaja iz načina vzgoje rastlin v drevesnicah, saj je tam praksa dodajanja gnojil, ki vsebujejo predvsem elemente dušik, fosfor in kalij (NPK), nekaj povsem običajnega. Gliva *F. circinatum* je največ škode povzročila v drevesnicah božičnih dreves v severni Karolini leta 1946. Bolezen so omejili s primernejšo vzgojo in drugačno pripravo rastnega substrata.

Na vitalnost rastline in njeno odpornost pred škodljivimi dejavniki vplivajo hranilne snovi v substratu, v katerem se rastlina razvija. Hranilne snovi delimo v makroelemente in mikroelemente. V našem poskusu smo uporabili dušik, kalij in fosfor ter kalcij in magnezij. Z različnimi koncentracijami NPK gnojil, ob enaki koncentraciji ostalih dveh

elementov (Ca in Mg), smo ugotavljali, kateri dodani elementi rastlini povečajo ali zmanjšajo odpornost na glivo *F. circinatum*.

Ker preučevana gliva *F. circinatum* lahko povzroči veliko ekonomske, ekološke in socialne škode (Wingfield in sod. 2001), smo želeli s poskusom pridobiti odporne sejanke. S tem bi rešili problem mnogih drevesnic, ki vzugajajo gostitelje tega patogena ter preprečili nadaljnje širjenje bolezni.

Praktični del diplomske naloge je bil izveden v Španiji, na univerzi v Extremaduri, Univerzitetnem centru za tehnični gozdarski inženiring (Ingeniería Técnica Forestal especialidad en Explotaciones Forestales, Plasencia) v Plasenciji, v okviru Erasmus izmenjave študentov. Poskus se je izvajal tri mesece, od aprila do julija 2008. Delo je potekalo pod vodstvom dr. Alejandra Solla Hach, rednega profesorja na omenjeni univerzi. Pri delu mi je pomagal diplomant na Univerzi Extremadura Alejandro Montero Romero, ki je izdelal diplomsko nalogu z enako tematiko. Doktorandka Maria Vivas je dobljene rezultate uporabila v svoji doktorski dezertaciji ter napisala članek (PRILOGA C), ki je bil predstavljen na 5. Nacionalnem gozdarskem kongresu v Španiji, ki je potekal od 21.-25. 9. 2009 v Avili.

Extremadura je pokrajina, ki leži v zahodnem delu Španije, ob meji s Portugalsko (slika 1). Je pomembno naravovarstveno območje Španije, z zelo pestrim živalskim in rastlinskim svetom. Na tem območju se nahaja tudi eden izmed 14 nacionalnih parkov v Španiji, imenovan Parque Nacional Monfragüe (slika 2). Območje je že od leta 1979 varovano kot naravni park, leta 2007 je pridobilo status Nacionalnega parka. Od leta 2003 je uvrščen v seznam svetovne dediščine, ki jo ščiti UNESCO, kjer ima status naravnega rezervata. Na tem območju so drevesne vrste *Pinus pinaster* in druge vrste borov močno zastopane. Ogroženost zaradi okužbe z boleznijo *F. circinatum* je zato lahko velika, zlasti na požarno ogroženih površinah. V primeru, da se pogorele površine pogozduje z rastlinami iz drevesnic, kjer je prisotna patogena gliva, je ogroženost teh območij lahko še večja.



Slika 1: Extremadura, Španija (Vir: Extremadura..., 2006)



Slika 2: Nacionalni park Monfragüe, Extremadura (Vir: Monfragüe..., 2004)

2 PREGLED OBJAV

2.1 *Fusarium circinatum* NIRENBERG & O'DONNELL

2.1.1 Sistematika

Teleomorf: *Gibberella circinata* Nirenberg & O'Donnell

Anamorf: *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell

Sinonimi: *Fusarium subglutinans* f.sp. *pini* J.C. Correll, T. R. Gordon, McCain, J. W. Fox, C. S. Koehler, D. L. Wood & M. E. Schultz; *Fusarium lateritium* f. sp. *pini*

Taksonomska klasifikacija: *Fungi: Ascomycota: Hypocreales: Nectriaceae*

Pogosto ime: borov smolasti rak (Slovensko); pitch canker of pine (Angleško)

EPPO koda: GIBBCI

Mnogo let je bila poznana samo nespolna oblika glive (anamorf) *Fusarium subglutinans* (Correll in sod. 1991). Od odkritja spolne oblike (teleomorf), ki se je razvila v laboratoriju, je gliva poznana tudi po imenu teleomorfa *Gibberella circinata* in imenu anamorfa *Fusarium circinatum* (Nirenberg in O'Donnell 1998).

Prvi opis glive *F. circinatum* leta 1946 (Hepting in Roth) pravi, da so bolezni podvrženi predvsem bori v fazah starejšega drogovnjaka in debeljaka. Kasnejše raziskave (Barnard in Blakeslee 1980, Dwinell in sod. 1985, Matthews 1962) so pokazale, da bolezen lahko povzroči poškodbe na neodpornih gostiteljih v skoraj vseh fazah razvojnega cikla (cvet, seme, sejanka, odraslo drevo). Okužbe in poškodbe so odvisne od starosti, genetske odpornosti, lokacije in vitalnosti gostitelja, kot tudi od mesta okužbe na gostitelju.

Primeri okužb: 1) lahko so okuženi ali uničeni storži in semena gostitelja. To je značilen in občasen problem, ki se pojavlja v semenskih sestojih, 2) že okužena in/ali kontaminirana semena lahko v drevesnicah povzročijo visoko smrtnost sejank, 3) okužba sejank, kjer simptomi še niso jasno izraženi, lahko vodi do propadanja mladih dreves v novo osnovanih

plantažah ter 4) okužbe na odraslih drevesih povzročijo deformacijo debla in krošnje, nepravilnen razvoj drevesa, zmanjšanje proizvajanja storžev in semen, zmanjša se vitalnost in stabilnost ter s tem večja verjetnost lomljenja vej in vrhov v primeru škodljivih abiotiskih dejavnikov, kot sta veter in žled.

Borov smolasti rak je endemičen v jugovzhodni ZDA. Znan je tudi v drugih koncih sveta (Correll in sod. 1991, Storer 1994, Dwinell in sod. 1985; Gedgil in sod. 2003, Sinclair in Lyon 2005). Za bolezen so dovzetne vse južne vrste rodu *Pinus*. Epidemije bolezni se pojavljajo raztreseno v času in prostoru. Frekvenca in jakost izbruha bolezni je v veliki meri odvisna od načina gospodarjenja z gozdovi. Večje epidemije bolezni so nastopile v sedemdesetih letih v umetnih nasadih bora (*Pinus elliottii* Engelm.), v centralni Floridi. Tam so zaznali skoraj 90 % okužbo dreves, smrtnost je v posameznih sestojih narasla do 25 % (Blakeslee in Oak 1970). Nato so se pojavili manjši izbruhi bolezni v nasadih *Pinus taeda* L. v jugovzhodnem delu ZDA (Kuhlman in Cade 1985). Na Floridi je leta 2001 bolezen borov smolasti rak postala nevarna v umetnih nasadih bora, saj so drevesa propadla že v začetnih fazah razvoja. Smrtnost le teh je bila izjemno visoka. Propadlo je 5 ha pogozdenih površin. Zlasti se je ta problem pojavljal na območjih, kjer so skušali spremeniti opuščene kmetijske površine v borove gozdove. Najbolj so bili prizadeti predeli, kjer so prej rasle stročnice in citrusi (Bernard, neobjavljen). Sejanke, s katerimi so površine pogozdili, so izvirale iz drevesnice na Floridi.

Izbruhi bolezni borovega smolastega raka so najbolj uničajoči v območjih, kjer za bolezen najbolj dovzetni bori rastejo v neprimernih razmerah. Te so prevelika koncentracija gnojil v prsti ter izpostavljenost vodnemu stresu (Claeson in Smith 1977, Fisher in sod. 1981, Schmidt in sod. 1976). Kot dokaz obstajajo opaženi izbruhi bolezni 1) v neposredni bližini perutninskih farm, 2) na prekomerno pognojenih borovih plantažah, 3) v sestojih, pognojenih in/ali namakanih z vodami, ki vsebujejo industrijske odplake (anorganske in organske) ter 4) na intenzivno obdelanih površinah kot so npr. igrišča za golf. Zabeležen je tudi primer, kjer je bila gliva *F. circinatum* glavni vzrok za visoko smrtnost dolgoiglicastega bora (*Pinus palustris* Mill.). Izpostavljen je bil emisiji dušika, zlasti amoniaka, ki je izhajal iz kemične industrije v neposredni bližini sestoja.

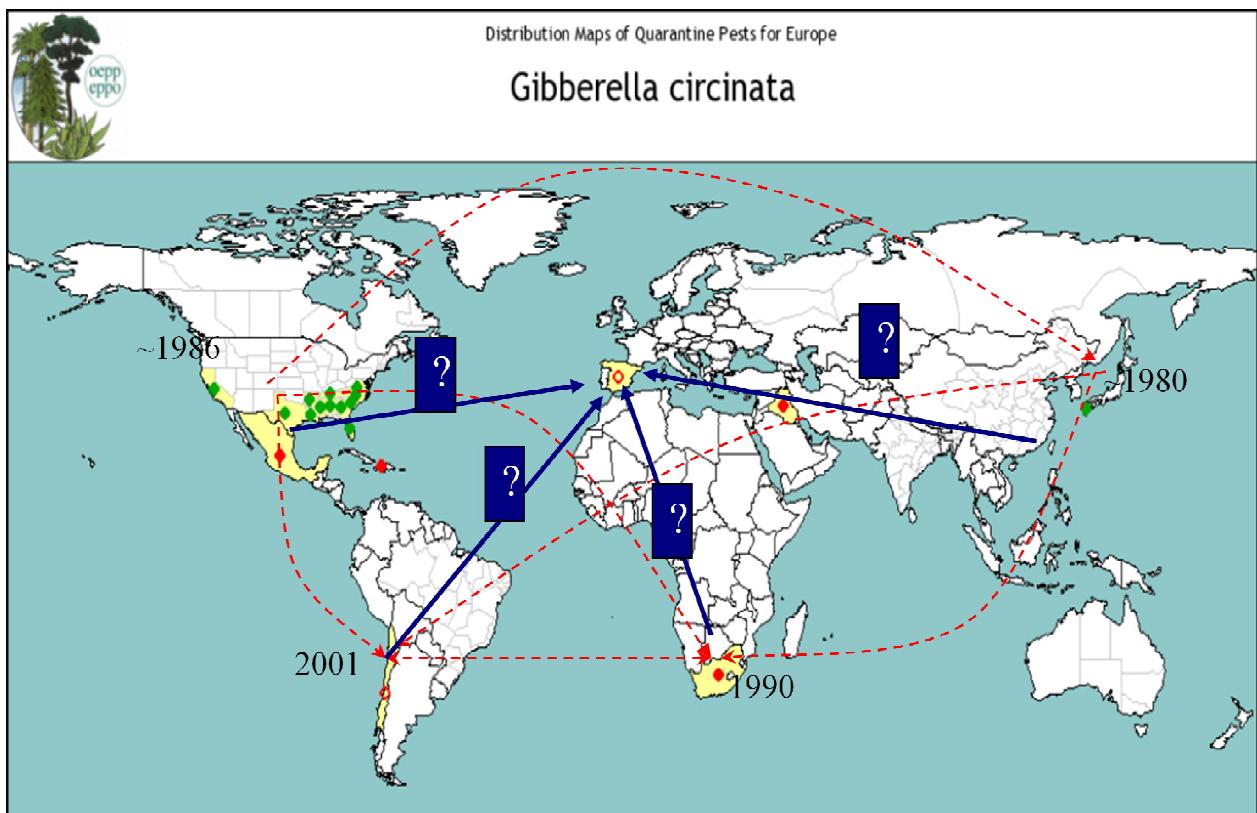
2.1.2 Gostitelj

Gliva *Fusarium circinatum* je sposobna okužiti vrste iz rodu *Pinus* spp. V severni Ameriki so najbolj ogrožene domače vrste kot so: *Pinus elliottii*, *P. palustris*, *P. patula*, *P. radiata*, *P. taeda*, *P. virginiana*. Bolezen je bila opažena na več kot 30 ostalih vrstah iz rodu *Pinus* spp., vključno na Evropskih vrstah kot so *P. halepensis* (alepski bor), *P. pinaster* (obmorski bor) in *P. sylvestris* (rdeči bor). Patogena gliva je prisotena tudi na nekaterih vrstah bora, ki so bile iz severne Amerike prenešene v Evropo. To so predvsem *P. contorta* in *P. strobus* (zeleni bor). Občutljive so tudi Azijske vrste *P. densiflora* in *P. thunbergiana*. Poznan je tudi osamljen primer okužbe duglazije, *Pseudotsuga menziesii*, kjer bolezen ni povzročila večjih poškodb.

2.1.3 Geografska razširjenost vrste

Prvič je bila bolezen borov smolasti rak opažena leta 1946 v jugovzhodnih Združenih državah Amerike (Hepting in Roth, 1946), kjer je gliva povzročila veliko škode na borovih plantažah in semenskih sestojih (Dwinell, Barrows-Broaddus in Khulman 1985). Bolezem se je širila po jugovzhodnih ZDA (Kuhlman in sod. 1982; McCain in sod. 1987), na Japonsko (Muramota in Dwinell, 1990), v Mehiko (Guerra-Santos 1999), v Južnoafriško republiko (Viljoen in sod. 1994), v Čile (Wingfield in sod. 2002) in na Novo Zelandijo (Ormsby 2004).

Pred kratkim se je bolezen pojavila tudi v Evropi. Prva detekcija bolezni je dvomljiva. Že leta 1986 je italijanski fitopatolog Motta omenjal pojav te bolezni v Evropi, vendar se je poročilo kasneje izkazalo za identifikacijsko pomoto. Nato je leta 1998 Dwinell s sodelavci poročal o izbruhu bolezni v Španiji (European and Mediterranean..., 2000). Bolezen so zaznali v plantažah obmorskega (*Pinus pinaster*) ter kalifornijskega bora (*Pinus radiata*). Kasneje je leta 2005 Landeras s sodelovci ponovno poročal o novem izbruhu bolezni v severni Španiji, na severovzhodni obali Galicije.



Slika 3: Širjenje glive *F. circinatum* in možnosti vnosa v Španijo (Vir: *Gibberella circinata...*, 2006)

Lokalno širjenje bolezni poteka s pomočjo vetra in žuželk, zlasti iz rodu rilčkarjev in podlubnikov (*Curculionidae, Scolytidae*). To so vrste hroščev, ki se prehranjujejo s semenami in lesom rastlin. Tako raznašajo mikro in makrokondide patogena iz gostitelja na gostitelja. Z vrtanjem v storže in semena prenesejo trose v novo generacijo gostitelja ter tako povzročajo propad naravnega podmladka.

Problem v drevesnicah in na plantažah je širjenje bolezni po koreninskem sistemu. Tako lahko patogena gliva napade celoten koreninski pletež, kar lahko povzroči propad celotnega nasada sejank.

Na dolge razdalje se bolezen prenaša z okuženimi semenami, sadikami, lesom in zemljo. S sajenjem in sadnjo okuženih osebkov se bolezen prenese na območja, kjer je prej ni bilo. Gliva se lahko prenaša s transportom neobeljenega lesa, lesnih polizdelkov ter z mletim lesom in skorjo, ki se navadno uporablja kot biomasa za proizvajanje energije. Spore v primernih okoljskih pogojih preživijo v posekanem lesu in semenih pol leta, v prsti eno

leto. Tako se je najverjetneje bolezen prenašala iz ZDA na Japonsko, v Mehiko, Južnoafriško republiko, v Čile, na Novo Zelandijo, v Evropo,...

2.1.4 Biologija patogena

Okužbe zaradi *F. circinatum* se pojavi na borovih vejah kot rakove tvorbe na skorji. V naravi teleomorf ni bil najden, zato lahko smatramo, da širitev bolezni ni odvisna od askospor. Do okužbe gostitelja pride zaradi makrokonidijev in/ali mikrokonidijev, ki jih v naravi raznašajo veter ter žuželke. Značilno je, da se hrošči, ki se prehranjujejo in živijo v lubju (npr. *Pityophthorus* spp., *Ips paraconfusus* Lanier, *Conophthorus radiate* Hopkins, *Ernobius punctulatus* LeConte), zadržujejo v že okuženih delih drevesa. Micelij glice se razrašča pod skorjo. Odrasli osebki, okuženi s konidiji patogena, tako prenašajo bolezen na druge gostitelje. Na novih gostiteljih povzročijo rane, ki so primerne za vdor bolezni (Storer in sod. 1997).

Ker je za razvoj bolezni potrebna velika vsebnost vlage v zraku ter relativno visoka temperatura, se največ okužb pojavi na območjih oz. v letnem času, ko so ti pogoji izpolnjeni. Tako je npr. v jugovzhodnih ZDA v času poletnih neviht (Dwinnell in sod. 1985), v Kaliforniji se bolezen pojavlja v neposredni bližini obale. Ravno tako je prva detekcija bolezni v Evropi na severozahodni obali Španije (Landeras in sod. 2005).

Glede na to, da se bolezen pojavlja le na območjih s toplejšimi temperaturami zraka, lahko sklepamo, da nižje temperature na patogeno glivo delujejo restriktivno (Gordon in sod. 2001).

Gliva v okuženem lesu pri zmernih temperaturah prezivi tudi leto in več, v zemlji pol leta.

2.1.5 Detekcija in determinacija

Gliva lahko okuži veje in debla dreves vseh starosti. Infekcija se na odraslih gostiteljih kaže kot značilno rdečeobarvanje iglic v vrhovih vej ter povešanje terminalnih poganjkov na okuženih vejah. Odmiranje vej se najpogosteje pojavlja od konca poletja do jeseni.

Iglice nad mestom okužbe začnejo veneti, nato spremenijo barvo (iz temno zelene, preko rumene v rjavo barvo). Na mestu okužbe se pojavi velika količina smole. Okužene veje počasi odmrejo v roku enega meseca, odvisno od aktivnosti patogena. Starejše okužbe prepoznamo po temno, sivorjavo obarvanih iglicah na koncih vej. Odmrli poganjki lahko ostanejo na drevesu tudi do enega leta. Iglice so oblite z izločeno smolo, tako da ne odpadejo z drevesa (slika 5B).



Slika 4: Simptomi bolezni na odraslih drevesih. A) odmiranje vrhov okuženih dreves, B) povečana količina smole na okuženih vejah, C) povečana količina smole pod skorjo okužene veje, D) sporodohiji glive *F. circinatum* se nahajajo na brazgotinah, kjer so izraščale iglice (Vir: Barnard E. L., Blakeslee G. M. 2006)

Hitrost odmiranja drevesa je odvisna od mesta, števila in intenzivnosti posameznih okužb. Če se miceliji glive, ki okužijo drevo na različnih mestih združijo in obdajo celoten obod debla ali veje, vrh drevesa ali veje odmre. Patogen lahko na gostitelju živi več let. Na mestih razvoja uniči kambialne celice, zato je na teh predelih razvoj premora debla ali veje neenakomern. Patogen povzroči povečano izločanje smole na površini skorje, kot tudi v lesu, zato je les na mestu okužbe značilno jantarno obarvan (Blakeslee in sod. 1980) (slika 4).



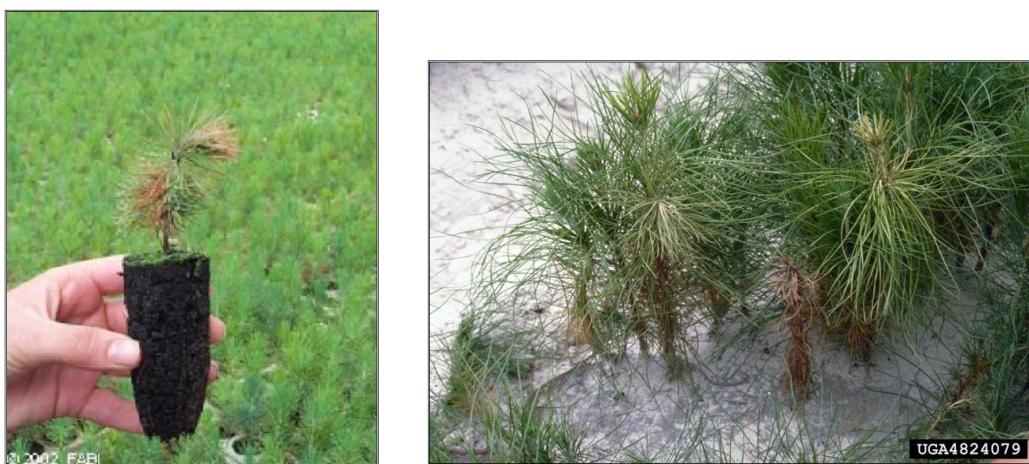
Slika 5: Značilno jantarno obarvan les kot posledica povečanega smolenja gostitelja, zaradi okužbe s patogeno glivo *F. circinatum* (Vir: Further outbreaks...2008)

V gozdu in v drevesnicah lahko gliva okuži tudi sejanke. Simptomi se kažejo kot padavica sejank, nenadno venenje in odmiranje mladih sadik, nekroza terminalnih poganjkov, odmiranje že olesenelih, nekoliko starejših sejank. Olesenele sejanke, stare od 1 do 2 leti so velikokrat okužene na ali tik ob tleh. Tipični simptom okuženih sejank je gnitje hipokotila blizu ali na površini tal, kar povzroči padanje sejank. Posledica je povečano smolenje koreninskega vrata in debla, kar onemogoči črpanje hraničnih snovi (slika 6).



Slika 6: Primer izgleda koreninskega sistema pri rodu *Pinus*, okuženega s *F. circinatum* A) v drevesnicah in B) v naravnem sestalu (Vir: Barnard E. L., Blakeslee G. M. 2006)

Posledično terminalni poganjki venejo, spremenijo barvo in odmrejo. Sejanke se lahko okužijo tudi s substratom, ki vsebuje patogeno glivo. V obeh primerih se simptomi ne razlikujejo veliko od ostalih patogenov, ki povzročajo padavico sejank (slika 7). Okužba korenin se najpogosteje pojavlja v drevesnicah (prim. drevesnice z božičnimi drevesi v ZDA), ni pa izključeno tudi gnitje izpostavljenih korenin odraslih dreves v plantažah.



Slika 7: Primer okužbe sejank v drevesnicah (Vir: Barnard E. L. 2001)

V drevesnicah gliva okuži celotni koreninski pletež sejank. Pojavi se rjava diskoloracija ter razkroj skorje. Nadzemni simptomi se pokažejo, ko gliva doseže koreninski vrat ter micelij

obda steblo sejanke. To nato vodi do venenja in spremembe barve iglic, ki se iz temno zelene preko rumeneobarvajo rjavo.

Gliva lahko povzroči tudi odmiranje ženskih cvetnih zasnov kot tudi zrelih storžev (slika 8). Vpliva na kakovost semen (Barrows-Broaddus 1987, Carey in sod. 2005, Miller in Bramlett 1979). Okužena semena kažejo različne znake, ki se razlikujejo pri posameznih vrstah borov. Lahko 1) so semena manjša kot običajno, 2) pride do rožnatega obarvanja storžev, 3) se pojavi nekroza storžev, 4) se izjemno poveča izločanje smole.



Slika 8: Primer okužbe storžev (Vir: Barnard E. L. 2001)

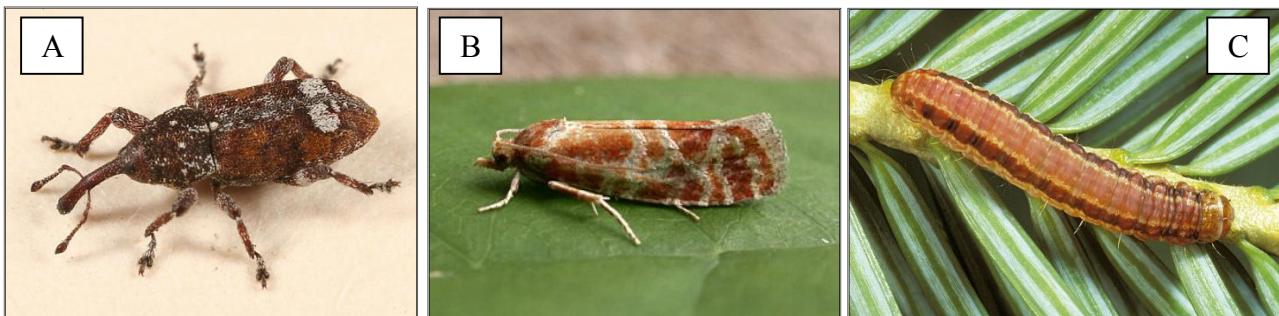
Gliva se lahko nahaja tudi na semenih, v notranosti ali na površini. Tako so sejanke že v začetnem razvojnem stadiju okužene s patogenim mikroorganizmom. Okuženost semen je težko ugotoviti. Potrebna je izvedba laboratorijske izolacije glive, ki se nahaja na semenih. Na podlagi dobljenih čistih kultur, se nato določi vrsta patogena.

2.1.6 Prenašalci bolezni

Okužba gostitelja se lahko pojavlja skozi celo leto, vendar najbolj pogosto konec poletja in jeseni. V tem času je velika verjetnost neviht in močnega vetra, kar poveča raznos spor v okolico. Tedaj se poveča tudi dovezetnost dreves na bolezen, saj ima patogena gliva večjo verjetnost, da vdre v gostitelja skozi rane, ki so nastale zaradi zunanjih škodljivih dejavnikov (Khulman in sod. 1982). Hkrati se v tem času na mladih zelenih poganjkih prično hrani rilčkarji *P. nemorensis* Germ., v južnem delu ZDA znani prenašalci bolezni borov smolasti rak, ki v gostitelja s hranjenjem vnašajo spore patogene glive (slika 9).

Gliva proizvaja konidije v galerijah in bobilnicah, ki jih izdelujejo tik pod skorjo odmrlih ali mrtvih dreves.

Ker je *F. circinatum* gliva, ki gostitelja okuži skozi rane, je okužba velikokrat povezana z razmerami v okolju. Največ okužb se pojavlja na območjih, kjer so drevesa poškodovana zaradi škodljivih okoljskih dogodkov (snegolomi, vetrolomi,...), kjer so drevesa poškodovana zaradi človeške dejavnosti (rane nastale zaradi pridobivanja storžev v semenskih sestojih, poškodbe v drevesnicah božičnih drevesc, prekomerno gnojenje, onesnaženost substrata,...) ter kjer je velika koncentracija žuželk, ki s hranjenjem povzročajo rane (*P. nemorensis*, *Dioryctria* spp., *Rhyacionia* spp.) (Dwinell in sod. 1980, Matthews 1962). V drevesnicah je bolezen največkrat prinešena z okuženimi semenji (Carey in sod. 2005), ni pa izključena možnost, da se spore prenašajo z vetrom.



Slika 9: Prenašalci bolezni; A) *Pisodes nemorensis* Germar (Vir: Murray T. 2007), B) *Rhyacionia* spp. (Vir: Whinney N. 2010), C) *Dioryctria* spp. (Vir: Dioryctria...2009)

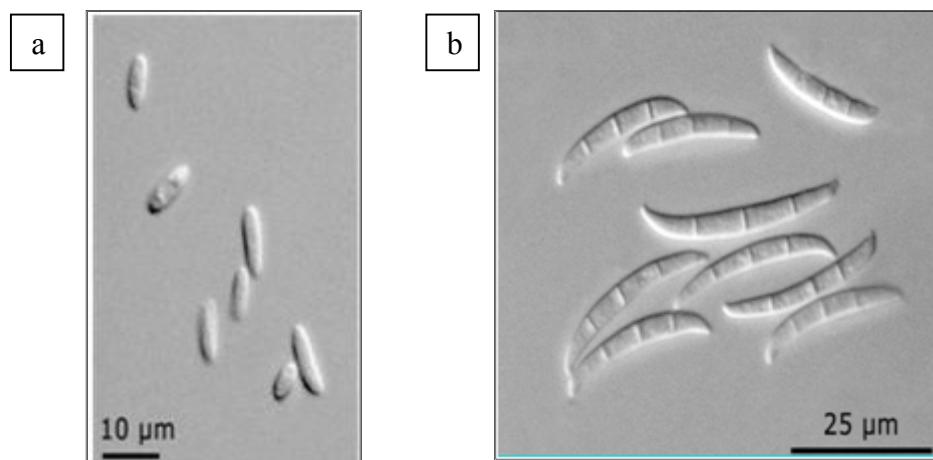
2.1.7 Morfologija

Okužba z borovim smolastim rakom se prične z mikroskopskimi sporami imenovanimi konidiji. Konidiji nastajajo v majhnih (< 3 mm) bradavičastih sporodohijih, rožnato-oranžne barve, ki nastajajo na odmrlih ali odmirajočih vejah. Sporodohiji se največkrat pojavijo na brazgotinah odpadlih iglic (slika 5D), lahko pa tudi na steblu okuženih sejank (Barnard in Blakeslee 1980).

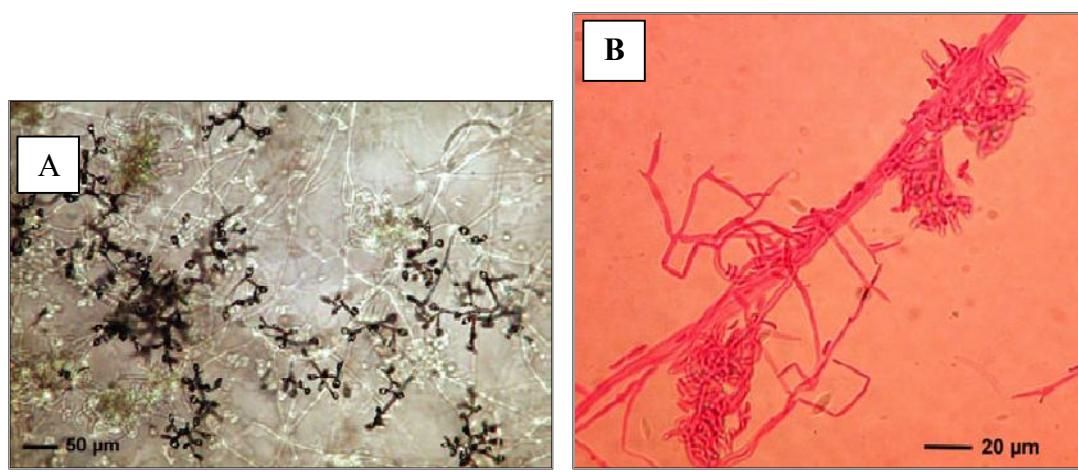
V kulturi gliva *F. circinatum* proizvaja mikro in makrokonidije (Nirenberg in O'Donnell 1998). Makrokonidiji imajo tri septe, stene so rahlo ukrivljene, velike so okoli 32-48 x 3,3-

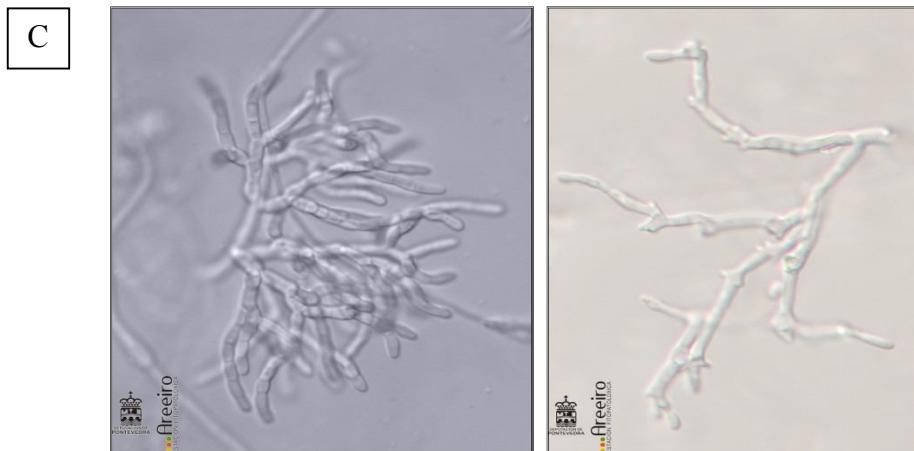
3,8 μm (slika 9). Podobni so drugim vrstam iz rodu *Fusarium*, zato je na podlagi morfoloških znakov težko determinirati vrsto. Za popolno identifikacijo vrste je pogosto potrebna uporaba molekularnih metod.

Mikrokonidiji so enocelični, prosojni in navadno ovalne oblike. Nastajajo v gručah na polifalidah. Konidiofori mikrokonidijev se razvijejo v obliki hifnih zvitkov. Pridevek *circinatum* pomeni zvito, kar je značilno za hife glive. Od tod tudi izhaja njeno ime (slika 11).



Slika 10: Mikrokonidiji (a) in makrokonidiji (b) (Vir: Leslie J.F. in Summerell B.A. 2006)





Slika 11: A) Hifni zvitki s konidijofori, na katerih se nahajajo mikrokonidiji, B) skupina spiralasto zvitih hif in polifialidičnih konidioforov (Vir: EPPO Bulletin, 2009) ter C) hifni zvitki (Vir: Presence of..., 2006)

Glivni micelij, ki se razvija v čisti oblikah, je puhost in bel. Lahko je tudi rahlo vijolično obarvan, predvsem v sredini kulture (slika 12).



Slika 12: Sterilni micelij glive vzgojen na PDA (Vir: 04 Fusa circi PDA..., 2007)

Spolna oblika glive, *Gibberella circinata*, se v naravi ne pojavlja. Njen razvoj je do zdaj zabeležen samo v čistih kulturah, vzgojenih v laboratoriju.

Morfološko razlikovanje vrste ni vedno zanesljivo, zato je potrebno za točno determinacijo uporabiti različne molekularne metode. Identifikacija temelji na prepoznavanju značilnih bolezenskih znamenj. Iz gostitelja izoliramo patogno glivo ter v laboratoriju vzgojimo čisto

kulturo. Če so bolezenska znamenja gostitelja in morfološki znaki glive enaki kot je opisano zgoraj, je determinacija uspešna. Za popolno prepričanje izvedemo dodatno inokulacijo gostitelja s patogeno glivo ter spremljamo razvoj simptomov (Correll in sod. 1991).

2.1.8 Ekonomski in varstveni problem

Borov smolasti rak, ki ga povzroča gliva *F. circinatum*, je resna bolezen, ki prizadene borove plantaže in drevesnice na različnih koncih sveta (Dwinel in sod. 1985, Viljeon in sod. 1994). V jugovzhodnih ZDA je bolezen povzročitelj velike škode v proizvodnji in plantažah z vrstami *Pinus* spp. ter v drevesnicah (Barnard in Blakeslee 1980) in semenskih sestojih (Dwinell in sod. 1981; Dwinell in sod. 1985). V naravnih gozdovih škoda ni velika. Bolezen predstavlja izgube pri kvaliteti in količini, vendar celoletne izgube niso zelo velike. Največ škode je zabeleženo v letih od 1974 do 1979 (Dwinell in sod. 1985), ko so bila najbolj prizadeta območja z južnimi vrstami bora kot je *Pinus elliotti*. V tem času so bile na Floridi izgube zaradi borovega smolnatega raka med 13,6 in 30,7 miljonov kubičnih metrov lesa na leto. Nato so z uvedbo bolj odpornih genotipov in s spremembami v načinu pogozdovanja, močno zmanjšali vpliv patogene glive. Naslednje večje izgube zaradi te bolezni so se pojavile v Kaliforniji leta 1986, kjer je bila prizadeta vrsta *Pinus radiata* v urbanem okolju in v naravnih gozdovih. Ta vrsta bora je bila v Kaliforniji izjemno priljubljena v urbanem okolju kot okrasno drevo ali za snovanje drevoredov. Kalifornijski bor so sadili ob prometnicah, kjer je služil kot zvočna in prašna zaščita, hkrati je imel tudi estetsko vlogo. Ravno ta drevesa so utrpela največjo škodo v sredini osemdesetih let v okrožju Santa Cruz. Stroški sanacije okuženih dreves in njihova menjava je narasla do nekaj miljonov ameriških dolarjev (Templeton in sod. 1997). Okužene so bile tudi ostale vrste borov. Odkar je bolezen prisotna v Južnoafriški republiki, je veliko semenskih sestojev, namenjenih za pridobivanje semenskega materiala vrst *Pinus* spp. , utrpelo velike izgube (Viljoen in sod. 1994). Enak učinek je bolezen povzročila v Čilu.

2.1.9 Kontrola

Preventiva je najučinkovitejši način zmanjševanja izgub zaradi *F. circinatum*. Pomembna je pravilna tehnika gojenja. V jugovzhodnih ZDA so problem s patogeno glivo rešili s čim bolj natančno kontrolo bolezni, v dobro organiziranih drevesnicah. Uporabljati so pričeli manj dovzetne rastline ter preprečevali raznos patogenega organizma s pravočasnimi sanitarnimi ukrepi (Dwinell in sod. 1985). Kemične in biološke metode za preprečevanje bolezni so neučinkovite in ekonomsko nesprejemljive. V upoštev pride le tretiranje semen s fungicidi.

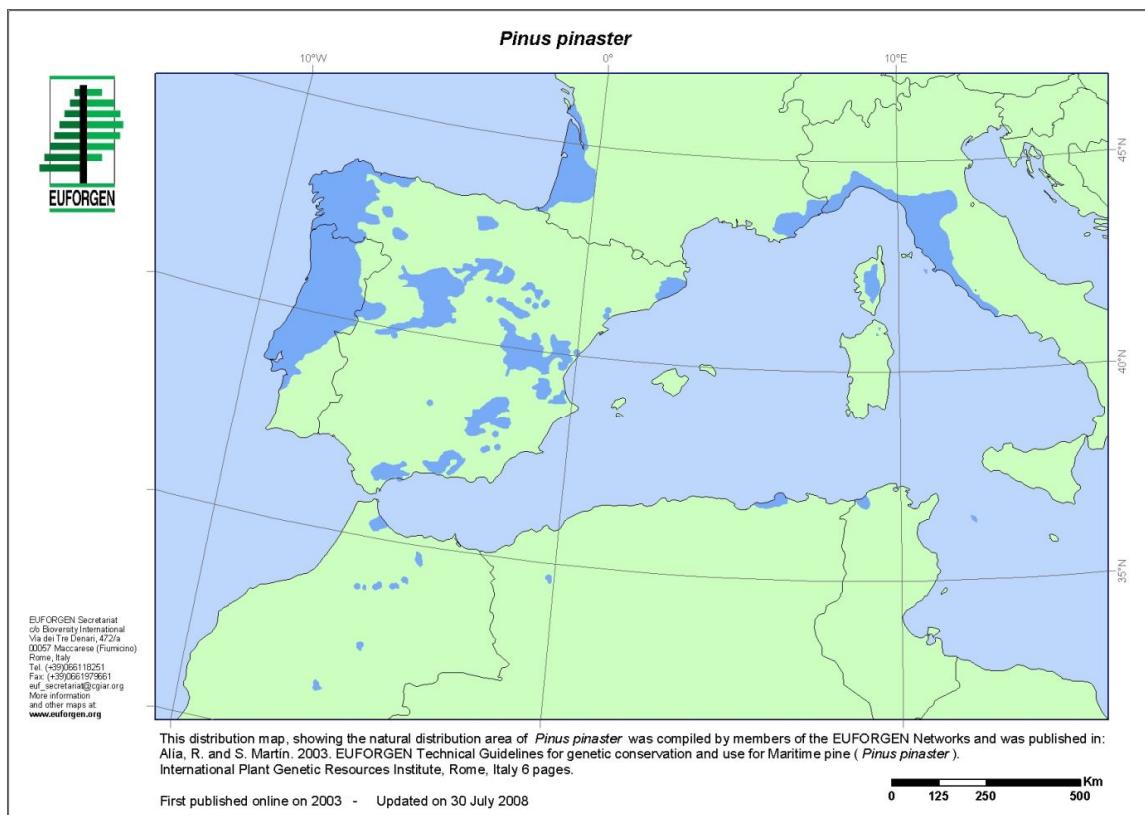
Pomembno je, da so drevesnice locirane na primerem območju, in da se uporabljam neokužena semena, pridobljena iz naravnih gozdov. Preprečiti je potrebno preobilno gnojenje ter poskrbeti, da semenskega materiala ter sejank ne poškodujemo, saj s tem povzročimo lažji vdor glive v gostitelja. Na splošno je potrebno v drevesnicah zagotoviti dobro higieno tako pri semenih in sejankah, kot tudi pri orodju ter zemlji. V plantažah se okuženih dreves ne sme prenašati, saj lahko tako prenesemo tudi bolezen. Z lopljenjem in izdelavo lesa na samem mestu poseka preprečimo raznos bolezni z žuželkami.

Obsežne raziskave v Ameriki so pokazale, da obstajajo velike razlike v dovzetnosti za bolezen med različnimi vrstami bora (Hodge in Dvorak 2000). *Pinus radiata* predstavlja vrsto, ki je zelo občutljiva na bolezen, vendar je sama dovzetnost nanjo močno odvisna od okolja kjer osebki rastejo (naravni gozd ali plantaže) (Storer in sod. 1999, 2002). Izkazalo se je, da so drevesa v plantažah bolj podvržena bolezni, posledično so tudi večje ekonomski izgube. Enako je bilo opaziti pri vrstah *P. elliottii* (Dwinell in Phelps 1977), *P. taeda* in *P. virginiana* (Kelley in Williams 1982, Kuhlman in sod. 1982, Barrows-Broaddus in Dwinell 1984).

V primeru, ko je okuženo drevo, ki ima veliko ekonomsko vrednost, se bolezen skuša omejiti s higiensko primernim obvejevanjem prizadetih delov. Če je okuženo drevo le eno izmed redkih v sicer zdravem sestojtu, je varnejše, da okužen osebek čim prej odstranimo in uničimo. Na splošno je najboljša zaščita pred boleznijo sadnja vrst, ki niso bori, ali vrste borov, ki so za to bolezen manj dovzetne. V Kaliforniji so tako začeli gojiti sredozemske vrste bora, ki so na to bolezen bolj odporne kot domače vrste (Gordon in sod. 1998).

2.2 *Pinus pinaster* AIT.

Pinus pinaster, slovensko ime obmorski bor, je vrsta bora, ki spada k sredozemsko-atlantskemu flornemu elementu. Za svojo uspešno rast potrebuje nekaj več vlage, kot je to potrebno za uspevanje alepskega bora (*P. halepensis*) in pinije (*P. pinea*), zato je včasih lahko prizadet zaradi poletne suše. Dobro prenaša izjemno visoke temperature. Ne prenaša nizkih temperatur in mraza. Najraje raste na peščenih, silikatnih, kislih tleh. Včasih uspeva tudi na apnencu, vendar so večji sestoji redki. Zadovolji se z revnimi tlemi. Je zelo svetloljubna vrsta ter dobro prenaša slana tla in sol v zraku. Že samo ime nam pove, kje se ta vrsta najpogosteje nahaja. Naravno je razširjen samo v zahodnem Sredozemlju. Raste na Pirenejskem polotoku in se ob atlantski obali širi proti Franciji. Nekaj naravnih nahajališč je tudi v Alžiriji, Maroku in Tuniziji. Vzhodna meja razširjenosti je na zahodnih obalah Apeninskega polotoka. Navadno raste v pasu ob morju, do nadmorske višine 1000 m, na Korziki ga najdemo na nadmorski višini 1600 m (cit. po Brus, 2004)



Slika 13: Razširjenost obmorskega bora (*Pinus pinaster* Ait.) (Vir: Distribution map...,2003)



Slika 14: Primer storža in semen obmorskega bora (Vir: *Pinus pinaster...*, 2007)

V zahodnem Sredozemlju, zlasti na atlantskih obalah, je pomembna pionirska drevesna vrsta. S svojim široko razraslim koreninskim sistemom in hitro rastjo v mladosti, je primerna drevesna vrsta za utrjevanje in stabiliziranje peščenih obmorskih brežin. S tem preprečujejo zasipanje s peskom in zmanjšujejo moč vetra v bližini obale. S to vrsto bora pogozdujejo tudi poleti izredno vroče peščene površine v notranjosti Pirenejskega polotoka. Primer večjih pogozditvenih površin je Extremadura, provinca v zahodni centralni Španiji, kjer je potekala izdelava praktičnega dela diplomske naloge.

V Extremaduri je podnebje zelo mešano. Prepletajo se vplivi mediterana iz južne smeri, atlantik blaži suho ozračje in visoke temperature iz zahoda ter vpliv celine, ki ustvarja kontinentalno klimo. Na splošno lahko rečemo, da so značila izjemno vroča in zelo suha poletja ter dolge blage zime. Povprečna letna temperatura se giblje med 16 °C in 17 °C. Temperature v severnem delu pokrajine so nižje kot tiste na jugu, saj v severnem delu relief dviguje v gorovje Sierra Morena. Poletne povprečne temperature so okoli 26 °C, nemalokrat se temperatura povzpe na 40 °C in več. Povprečna zimska temperatura je 7,5 °C (Extremadura..., 2006).

Velika površina plantaz obmorskega bora na tem območju Španije služi za pridobivanje lesa, ki ga uporabljam v gradbeništvu in papirni industriji. Kvalitetnejši les atlantske podvrste pa uporabljam tudi za proizvodnjo furnirja in parketa. V Španiji je še vedno

prisotno smoljarjenje. Veliko nasadov je namenjenih pridobivanju smole oz. francoskega ali bordojskega terpentina. Tudi eterična olja so produkt te drevesne vrste in jih uporabljajo v farmacevtski in kozmetični industriji. Veliki in lepi storži ter lubje se uporablja za razne dekoracije. Na območjih, kjer obmorski bor naravno ni razširjen, ga sadijo v parkih kot okrasno drevo.

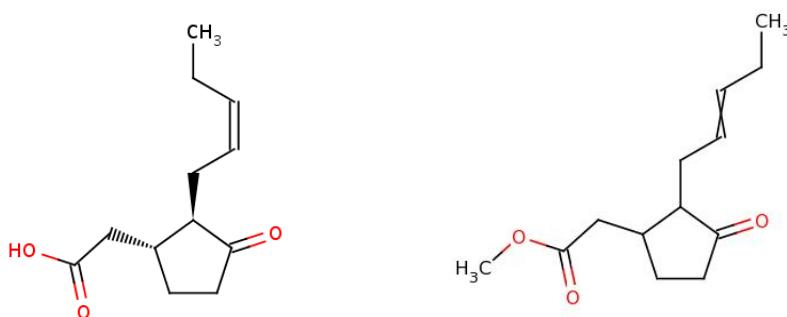


Slika 15: *Pinus pinaster* (njegov habitus) ter slika nasada z isto drevesno vrsto, Španija, Extremadura (foto: Vrhovnik M., 2008)

2.3 JASMONSKA KISLINA IN NJEN ESTER METIL JASMONAT

Preglednica 1: Kemijski zapis jasmonske kisline in metil jasmonata

	JASMONSKA KISLINA	METIL JASMONAT
IUPAC ime:	(-)-1 α , 2 β -3-okso-2-(cis-2-pentenil)-ciklopantanonska kislina	Metil (1R, 2R)-3-okso-2-(2Z)-2-pentenil-ciklopantanacetat
Molekulska formula:	C ₁₂ H ₁₈ O ₃	C ₁₃ H ₂₀ O ₃
Molska masa:	210,27 g/mol	224,3 g/mol



Slika 16: Molekularna zgradba jasmonske kisline (levo) in metil jasmonata (desno) (Vir: Jasmonic acid, 2009)

2.3.1 Jasmonati

Jasmonati, derivati ciklopantanona, biosintetsko izvirajo iz linolenske kisline. Gre za oksilipine, ki so bioaktivni derivati maščobnih kislin (Peña-Cortes in sod. 2005). Jasmonati so signalne molekule, ki sodelujejo pri razvoju rastlin in pri njihovem odzivu na stres (Brinc, 2003). V skupino jasmonatov spadajo jasmonska kislina (JA), njen ester metil jasmonat (MJ), njeni aminokislinski konjugati in ostali metaboliti kot je 12-hidroksijasmonska kislina (12-OH-JA). Oktadekanoidna cis-(+)-12-oksofitoidna kislina (PDA) je prekurzor JA (Stenzel in sod. 2008).

Pot biosinteze poteka preko oktadekanoidne poti, sestavljeni iz vsaj 7 encimskih korakov. Končni produkt je (+)-7-iso-jasmonska kislina. To je fiziološko aktivna substanca, ki se hitro preoblikuje v svojo stereoizomero, stabilno (-)-jasmonsko kislino (JA). Najdemo jo v

rastlinah poleg njenega metilnega estra (MJ), aminokislinskih konjugantov, glukoznih estrov in hidroksilnih oblik.

Glavna struktura, ki jasmonatom zagotavlja fiziološko aktivnost, je pentanoski obroč, ki ima na C7 pripeto pentenilno verigo, na C3 acetilno ali daljše stranske verige in keto skupino na C6. Jasmonate lahko zaznamo po celi rastlini, vendar so najbolj koncentrirani v meristemskih tkivih: v vršičkih poganjkov, v konicah korenin, nezrelem sadju in v mladih listih (Wasternack in Parthier 1997).

Metil jasmonat je bil izmed jasmonatov, leta 1962, prvi izoliran in kemično identificiran kot sestavni del esencialnega olja iz jasmina (*Jasminum grandifolia* L.) in rožmarina *Rosmanrinus officinalis* L.), medtem ko so prosto jasmonsko kislino izolirali leta 1971 iz kulture glive *Lasiodiploida theobromae*. Creelman in Mullet (1997) navajata, da je aktivnost metil jasmonata večja kot aktivnost jasmonske kisline, kar naj bi bila posledica bolj hlapljive oblike in lipofilne narave. V poskusu smo uporabili to obliko hormona.

MJ je poleg samega obrambnega delovanja v rastlini tudi pomemben komunikacijski element med rastlinami, saj se hlapljive molekule kot signali prenašajo po zraku (Farmer in Ryan 1992, cit. po Peña-Cortes in sod. 2005).

Če jasmonate dodajamo eksogeno, prihaja do različnih pleiotropnih vplivov, ki v celotni rastlini ali pa samo v določenem organu, delujejo indukcijsko ali inhibicijsko na fiziolške in biološke procese. V večini primerov gre za spremenjeno ekspresijo genov (Wasternack in Parthier 1997).

2.3.2 Funkcija metil jasmonata in jasmonske kisline v rastlini

Splošna prisotnost jasmonatov in raznolikost njihovih bioloških vplivov, uvršča te substance med rastlinske hormone. Eksperimenti izvedeni leta 1990 so pokazali kako močan vpliv imata MJ in JA kot signalni molekuli na izražanje obrambne reakcije rastline v stresnih razmerah. Spoznanje le tega je pritegnilo veliko pozornosti med znanstveniki, saj lahko s pomočjo zunanjega dodajanja MJ ali JA vplivamo na odpornost rastlin na patogene dejavnike.

Sinteza JA od linolenske kisline preko oktadekanoidne poti je aktivirana, ko je rastlina v stresnem stanju. Stres v rastlini je lahko povzročen zaradi okužbe s patogenimi organizmi (glive, virusi, bakterije), ranitve (žuželke, abiotski dejavniki), zaradi osmotskega stresa ali poškodbe zaradi UV svetlobe. Načeloma JA in MJ nastajata vedno, kadar pride do poškodbe celične membrane (Wasternack in Parthier 1997).

V zadnjem desetletju se je izkazalo, da sta JA in PDA neodvisna signala, ki delujeta pri odzivu na biotski ali abiotski stres. Kadar je rastlina pod stresom pride do povišanja endogene JA in PDA, povzročene z *de novo* biosintezo in sta del kompleksne signalne transduksijske poti (Stenzel in sod. 2008).

Vpliv JA in njenega estra MJ na razvoj in rast rastline je lahko zelo različen. Lahko inducira senescenco, abscizijo listov ali inhibira kalitev. Če pride do senescence, se zmanjša vsebnost klorofila v listih, zmanjša se aktivnost ribuloze bifosfat karboksilaze, akumulirajo se novi proteini (Creeman in Mullet 1995). Creeman in Mullet v istem članku (1995) navajata, da JA in MJ inhibirata rast korenin, inducira tvorbo gomoljev in stimulira zorenje sadežev. Pospešeno zorenje sadežev je najverjetnejše posledica vpliva JA in MJ na biosintezo etilena.

Če so jasmonati uporabljeni v nizkih koncentracijah, lahko inducirajo gene, ki kodirajo proteinazne inhibitorje, to so encimi flavonoidne in seskviterpenoidne biosinteze, tionin, osmotin in lipoksiogenazo (Petrovič in sod. 1997). JA lahko inducira ekspresijo lipoksiogenaze, to je encim, ki je vključen v sintezi JA, in tako v rastlini sproži odziv na patogene organizme (Creeman in Mullet 1995). Že nizke koncentracije jasmonatov pospešujejo rast rastlin in razvoj korenin (Ravnikar 1991).

2.3.2.1 Oktadekanoidna signalna pot in biosinteza jasmonske kisline

Ko rastlino okuži patogeni organizem, se sistemsko inducirajo proteini iz 200 aminokislin, imenovan prosistemin, pretvori v sistemin. Sistemin je peptid sestavljen iz 18 aminokislin. Prenese se vzdolž floema. Zaznava tega proteina, preko še neznanega kompleksa receptorjev, sproži povišanje koncentracije linolenske kisline (LA) (Wasternack in Parthier

1997). A-linolenska kislina se ob začetku signalne poti sprosti iz membranskih lipidov s pomočjo encima fosfolipaze A (Creeman in Mullet 1997). Encim 13-lipoksigenaza (LOX), lociran v kloroplastu nato pretvori LA v 13-hidroksilolinolensko kislino. Ta se dalje pretvori z encimoma alenoksid sintazo (AOS) in alenoksid ciklazo (AOC) do PDA. Z redukcijo in tri kratno β -oksidacijo v peroksisomu se potem tvori (-)-jasmonska kislina (Wasternack in Parthier 1997). Ta se lahko kasneje konjugira v aminokislino. Poleg transporta signalnih molekul po žilnem sistemu rastline, lahko hlapni metabolite, kot je metil jasmonat, ravno tako igrajo pomembno vlogo pri signaliziraju znotraj rastline. Signaliziranje preko žilnega transporta v kombinaciji s hlapljivimi metaboliti pripelje do optimalne odpornosti oddaljenih delov rastline (Heil in Ton 2008).

2.3.2.2 Lokalni in sistemski odziv rastlin na ranitev

Aplikacija metil jasmonata na nepoškodovano skorjo pri vrstah družine Pinaceae, izzove enake reakcije rastlin, kot če bi prišlo do poškodbe skorje. Razlika je v tem, da se ne pojavijo poškodbe tkiv, nekroze, odmiranje skorje ali drugi znaki odmirajočega tkiva.

Zasluga za odpornost iglavcev na podlubnike in glive, ki živijo v skupni asociaciji, gre obrambnim mehanizmom, ki v rastlini že obstajajo ter tistim, ki se v primeru napada ali okužbe na novo inducirajo.

Kot je znano za Pinaceae, je produkcija smole v primeru poškodbe skorje s patogenimi organizmi, močno povečana (Lieutier and Berryman 1988, Lewinsohn in sod. 1991, Klepzig in sod. 1995). Poškodba izzove nastanek travmatskih smolnih kanalov, ki nastanejo v bližini rane. S tem drevo omeji nadaljnje razraščanje patogenih organizmov po deblu s t. i. barijerno cono. Tok smole je na mestu poškodbe tako velik, da je preživetje patogenih organizmov oteženo ali onemogočeno. Enako se zgodi v primeru eksogene aplikacije MJ.

Druga močna obrambna komponenta pri iglavcih so fenoli, ki nastajajo v polifenoličnih parenhimskih celicah (PPc). Te so ves čas prisotne v sekundarnem floemu in sodelujejo pri sintezi, skladiščenju in modifikaciji fenolov. PPc se v primeru poškodbe aktivirajo,

sprostijo fenole na mesto poškodbe ter v bljižno okolico rane (Franceschi in sod. 1998, 2000, Hudgins in sod. 2003, Krekling in sod. 2000).

Obrambne snovi, kot so smola in fenoli, ki so najbolj učinkoviti pri obrambi, bazirajo na terpenoidih ter mnogih drugih sekundarno formiranih snoveh, ki nastajajo preko fenilpropanoidnih poti (Klepzig in sod. 1991, Trapp in Croteau 2001). Skupno delovanje obstoječih ter induciranih obrambnih mehanizmov je ključni pogoj, da so iglavci, kljub številnim škodljivim organizmom, preživeli že več kot 200 miljonov let (Doyle 1998).

Poleg opisanih obrambnih snovi k učinkovitemu obrambnemu mehanizmu iglavcev pripomorejo tudi plasti periderma, lignificirane celične stene, floemska vlakna ter kristali kalcijevega oksalata (Weinhouse in sod. 1997).

2.4 HRANILNI ELEMENTI IN NJIHOV FIZIOLOŠKI POMEN PRI RASTLINAH

Med hrnilne elemente uvrščamo tiste kemijske elemente, ki so vključeni v proces pretoka energije znotraj ekosistema. Lahko so vgrajeni v osnovno zgradbo organskih snovi ali pa sodelujejo pri ključnih ekoloških in fizioloških procesih v rastlinah. Glede na količino elementa, ki ga rastlina potrebuje za normalen razvoj, elemente delimo v makrohranila in mikrohranila (cit. po Kotar 2005)

Med makrohranila štejemo vodik, ogljik, kisik, dušik, kalcij, kalij, fosfor, magnezij in žveplo. Med mikrohranila pa štejemo bor, klor, mangan, železo, baker, železo, mangan in nikelj. Nekatere rastline dodatno potrebujejo še natrij, silicij, krom, nikel, kobalt ter aluminij (Perry 1994, cit. po Kotar 2005).

Glede na vlogo posameznih elementov v rastlinski fiziologiji ter značilnosti njihovega kroženja v ekosistemih, hrnilne elemente delimo v štiri skupine:

1. **Skupina (C, H, O)** so elementi, ki tvorijo osnovno zgradbo organskih snovi. Ogljik služi kot ogrodje organskih molekul. Vodik in kisik sta vezana na ogljik in skupaj tvorijo ogljikove hidrate (sladkorji, škrob, celuloza), maščobne kisline (lipide in voske) in terpene ter fenole (lignin, tanin). Številne molekule, ki so zgrajene na osnovi teh treh elementov, služijo kot gradbeni elementi (lignin in celuloza) ali kot snovi z uskladiščeno energijo (sladkorji, škrob). Nekatere snovi služijo tudi kot zaščita proti patogenim glivam, objedanju ali ultravijoličnim (UV) sevanjem. To so zlasti terpeni in fenolne komponente.
2. **Skupina (N, S, P)** so elementi, ki se vežejo na ogljik (N in S) ali kisik (S in P). Kombinacije enega ali več elementov s skupino ogljika, vodika in kisika tvori pomembne organske molekule kot so: proteini (N, S), fosfolipidi (P) in nukleinske kisline (N, P). Vezava reduciranega N (NH_3) na CHO molekulo, ki ima skupino COOH, privede do osnovnih aminokislín, ki so sestavni del proteinov. Proteini imajo pri rastlinah predvsem vlogo regulacijskih in strurnih spojin. Aminokislíne, ki vsebujejo žveplo, določajo terciarno zgradbo beljakovin, t. j.

encimov in strukturnih spojin. Encimi v rastlinah vodijo in uravnavajo življenske procese. Fosfor ima funkcijo bistvene komponente pri transportnem sistemu energije v celicah, t. j. pri molekulah adenozin difosfat (ADP) ter adenozin trifosfat (ATP). Skupaj z dušikom je graditelj nukleinskih kislin, ki tvorijo DNA in RNA, je hkrati tudi pomembna sestavina fosfolipidov in gradnikov vseh membran.

3. **Skupina (Ca, K, Mg)** so elementi, ki so vezani na matično podlago. V obliki soli organskih kislin omogočajo električno nevtralnost v rastlini. Kot osmotski agenti vzdržujejo celični turgor. Od 15 % do 20 % magnezija najdemo vezanega v molekulah klorofila. Je pomemben element pri prenosu energije in služi kot povezovalni encim z ADP in ATP molekulami. Kalcij je gradbeni element srednje lamele in je pomemben pri rasti in delitvi celic ter zagotavlja pravilno delovanje membrane. Kalij je najbolj učinkovit monovalentni kation, ki služi za aktiviranje številnih encimov. Je bistveni element pri odpiranju in zapiranju listnih por. Vsi trije elementi te skupine so precej topni, zato so močno podvrženi izpiranju iz tal, hkrati pa so ravno zaradi velike topnosti rastlinam lahko dostopni.
4. **Skupina (Fe, Mn, Cu, Zn, Mo, B, Cl, Ni)** so elementi, ki so pomembni za delovanje encimov (z izjemo B in Cl). Mangan lahko nadomesti magnezij pri povezovanju encimov z ADP in ATP. Ima velik pomen pri prenosu elektronov ter dodatno vlogo kot klor v procesu fotosinteze pri sprostitevi kisika. Mangan skupaj z železom posredujeta pri prenosu elektronov znotraj celic in v tleh. Omogočata redoks reakcije, saj lahko menjata valentnost. Železo je bistven element citokromskega sistema in je vpletен v transport elektronov v procesu fotosinteze. Funkcija bora je pomembna pri transkripciji in translaciji v sintezi beljakovin ter pri regulaciji spolnega razmnoževanja. Sodeluje pri regulaciji transporta ogljikovih hidratov skozi celične membrane ter pri redoks reakcijah. Z izjemo železa, se vsi elementi nahajajo v matični podlagi v zelo majhnih količinah. So bolj ali manj slabo topni pri pH vrednostih v katerih rastejo rastline, zato je njihova dostopnost rastlinam zelo omejena. Topnost teh elementov narašča s katalizacijo. Kelati, ki vsebujejo huminske kisline in veliko drugih organskih snovi, ki se izločajo preko

korenin, mikoriznih gliv in drugih mikrobov v rastnem substratu, so pomembni pri oskrbi rastlin z elementi te skupine (Perry 1994, cit. po Kotar 2005).

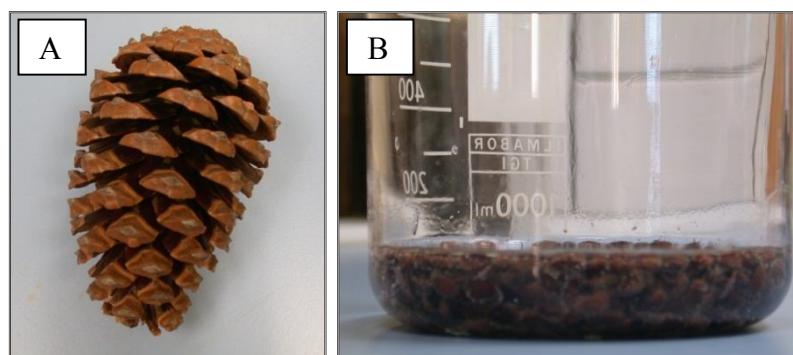
V našem poskusu smo sejankam dodajali hranilne elemente dušik, fosfor in kalij. Gnojenje spada med najpomembnejše agrotehnične ukrepe pri vzgoji rastlin. Tu se lahko pojavi problem prenasičenosti ali pomanjkanja hranilnih elementov v substratu. Eden izmed vzrokov razširjenja patogene glive *F. circinatum*, je v veliki meri odvisen od vsebnosti hranilnih elementov v rastlinah. Znano je, da je v borovih sestojih, ki rastejo na substratih, kjer je dodajanje NPK gnojil veliko in je prisotna patogena gliva *F. circinatum*, škoda zaradi bolezni zelo velika (Lopez-Zamora in sod. 2007). Nekaj epidemičnih izbruhov bolezni borov smolasti rak so zasledili v borovih nasadih, lociranih blizu perutninskih farm, v borovih nasadih s pretiranim gnojenjem, na območjih kjer so gnojili z industrijskimi odpadki (organskimi in anorganskimi) ter na umetno preoblikovanih območjih kot so golf igrišča (Barnard in Blakeslee 2006). Dušik se smatra kot hranilni element, ki v primeru prenasičenosti v substratu in rastlini lahko zmanjša odpornost rastline proti patogenim organizmom, saj zavira obrambni sistem rastline. Kalij povečuje odpornost proti boleznim, fosfor v rastlini izove različne odzive (Huber in Thompson 2007). Odziv rastline na patogen organizem v odvisnosti od hranilnih elementov je pogojen s koncentracijo elementov, ki jih dodajamo, s časovnim razporedom gnojenja, s stanjem rastnega substrata ter z interakcijo z drugimi elementi (Huber in Thompson 2007). Ni še znano, kako hranilni elementi v tleh vplivajo na odpornost obmorskega bora (*Pinus pinaster* Ait.) proti patogeni glivi *F. circinatum*.

3 METODA DELA

Praktično delo diplomske naloge je potekalo v Plasenciji, na Univerzitetnem centru za tehnični gozdni inženiring (Ingeniería Técnica Forestal especialidad en Explotaciones Forestales), na Univerzi v Extremaduri v Španiji. Delo je potekalo v njihovem laboratoriju ter v rastlinjaku. Poskus se je pričel 15. 11. 2007, ko je Maria Vivaz, doktorandka pod vodstvom dr. Alejandra Solla Hacha, posadila semena obmorskega bora kot je opisano v nadaljevanju. Moje delo se je začelo 21. 4. 2008. Sejanke so bile tedaj stare 5 mesecev. Praktično delo poskusa smo zaključili 25. 6. 2008. Delo je potekalo v okviru projekta »Los efectos maternos de *Pinus pinaster* en relación a la resistencia inducida. Histología y respuestas defensivas ante inoculaciones con *Fusarium oxysporum*«, ki je trajal od januarja 2006, do decembra 2009. Odločitev, da glivo *F. oxysporum* zamenjamo za *F. circinatum* je bila sprejeta naknadno, saj je bila patogena gliva *F. circinatum* v tem času v Španiji vse bolj navzoča ter je povzročala veliko škode v drevesnicah in borovih nasadih.

3.1 PRIPRAVA SUBSTRATA IN VZGOJA SEJANK *Pinus pinaster* AIT.

Za izvedbo poskusa smo potrebovali sejanke obmorskega bora. Vsa posejana semena so izvirala iz istega matičnega drevsja, ki raste na severozahodni obali Španije (Cangas, Pontevedra: $42^{\circ} 16' S$, $8^{\circ} 47' Z$, 126 n. m.).



Slika 17: A) Storž *Pinus pinaster* Ait., vir semen ter B) dezinfekcija semen v 30% raztopini H_2O_2 (foto: Vivaz M. 2007)

Kot substrat smo uporabili droben pesek, ki smo ga sprali pod tekočo vodo ter ga sterilizirali v avtoklavu pri temperaturi 121 °C. Preden smo semena posejali, smo jih pod tekočo vodo spirali 12 h. Da bi preprečili kakršnokoli okužbo semen, smo jih dodatno razkužili s 30 % raztopino vodikovega peroksida. Semena smo v 30 % H₂O₂ namakali 30 minut (slika 17). Po razkuževanju smo semena 10 krat sprali z destilirano vodo. Tako tretirana semena so bila pripravljena za setev.

Posode, namenjene rastnemu prostoru rastlin, so bile plastične, valjaste oblike, visoke 15 cm ter široke 5 cm ($V \approx 294 \text{ cm}^3$). Razkužili smo jih z 2 % peroksidom. Zapolnili smo jih s peskom ter v vsako posodo dodali po dve semenici *P. pinaster*. Nato smo jih zalili z destilirano vodo. Vsak lonček s sejanko smo posebej označili s številko.



Slika 18: Posode z razkuženim rastnim substratom (foto: Vivaz M. 2007)

Posode s semenicami so bile shranjene v sobi s stalno temperaturo 22 °C. Ko je vzklila zadostna količina semen, smo posode postavili v hladilnik s stalno temperaturo 4 °C. S tem ukrepom smo preprečili nadaljno kalitev. Vzklilo je 200 semen. Sejanke so bile po dveh mesecih rasti v laboratoriju prenešene v rastlinjak s konstantno temperaturo in vodnimi razmerami. Avtomatiziran namakalni sistem je vsakodnevno ob 18:00 uri zalival sejanke. Rastline so dnevno prejele 3 mm vode.



Slika 19: Izgled sejank, predno so bile prenešene v rastlinjak (foto: Vivaz M. 2008)

Po desetih dneh rasti v rastlinjaku, smo rastlinam začeli dodajati gnojila. Eksperiment je vseboval 8 različnih kombinacij gnojil kalija, dušika in fosforja, ki smo jih dodajali sejankam. Sejanke so bile razdeljene v dva bloka. Znotraj vsakega je bilo 9 skupin po 10 sejank, razen v skupini S2, kjer je bilo 40 sejank. Skupina K je služila kot kontrola, ki ji nismo dodajali gnojil. Skupno smo v poskus vključili 200 rastlin.



Slika 20: Tri mesece stare sejanke *Pinus pinaster*, razdeljene v 10 skupin po 20 rastlin (foto: Vrhovnik M. 2008)

Dodajanje gnojil je potekalo v obliki vodne raztopine, z različnimi koncentracijami gnojil. Kalij smo dodajali v obliki kalijevega nitrata, fosfor kot raztopino didušikovega hidrogenfosfata, dušik pa v raztopini amonijevega nitrata. Vsem sejankam smo dodali enako količino kalcija v obliki raztopine kalcijev sulfat dihidrat ter magnezija v obliki raztopine magnezijevega nitrata (Preglednica 2).

Preglednica 2: Tretiranje sejank *Pinus pinaster* s hraničnimi elementi. Prisotnost elementa je označena s +, odsotnost z -.

Gnojila	Raztopine	Odmerki	Skupine								
			Kontrola	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
N	Dušikov nitrat	5 mg N rastlina ⁻¹	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P	Didušikov hidrogen fosfat	1 mg P rastlina ⁻¹	-	+	-	+	-	+	+	-	-
K	Kalijev nitrat	3,5 mg K rastlina ⁻¹	-	+	+	+	+	-	-	-	-
Ca	Kalcijev sulfat dihidrat	0,35 mg Ca rastlina ⁻¹	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Mg	Magnezijev nitrat	0,45 mg Mg rastlina ⁻¹	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Sejanke smo z gnojili tretirali vsakih 10 dni. Dodali smo 5 ml raztopine na sejanko. Takšna nega je potekala 3 mesece. Kontrolna skupina je prejemala samo vodo.

22. 4. 2008, 5 dni po zadnjem dodajanju gnojil, smo sejanke izmerili z milimeterskim ravnalom. Izmerili smo dolžino steba in dolžino zelenega dela rastline. Dobljene podatke smo zabeležili v podatkovno datoteko. Primerjava različno razvityih sejank nam je v nadaljevanju služila pri ugotavljanju vpliva različnih koncentracij NPK gnojil na rast in razvoj sejank.

3.2 TRETIRANJE SEJANK Z METIL JASMONATOM TER INOKULACIJA SEJANK S PATOGENO GLIVO *Fusarium circinatum* NIRENBERG & O'DONNELL

Tri mesece stare sejanke smo razdelili v 4 bloke. Vsak blok je vseboval 50 sejank, razvrščenih v 9 skupin po 5 sejank, razen skupina S2, ki je vsebovala 10 sejank. Postopek razvrščanja je potekal v naslednjem zaporedju:

Prvo sejanko iz prve skupine smo uvrstili v blok I. Drugo sejanko iz prve skupine v blok II, tretjo v blok III in četrto v blok IV. Tako smo nadaljevali, dokler nismo v vsakem bloku dobili 10 skupin po 5 sejank, z različnimi koncentracijami NPK gnojil.



Slika 21: Potek razvrščanja tri mesece starih sejank *Pinus pinaster* v 4 bloke (foto: Krajnc B. 2008)

Blok I je služil za kontrolo. Na teh sejankah nismo izvajali nobenih dodatnih ukrepov. Sejanke v bloku II smo tretirali s sintetično pridobljenim metilnim estrom jasmonske kisline (MJ). Blok III je bil tretiranja z MJ in okužen s patogeno glivo *F. circinatum*. Sejanke v bloku IV smo okužili s patogeno glivo *F. circinatum*.

Po razdelitvi sejank v bloke, je sledila priprava raztopine metil jasmonata. Delo je potekalo v laboratoriju. Za raztopino 25 mM MJ smo potrebovali:

- 0,275 ml Tween® 20
- 250 ml destilirane H₂O
- 1,41 ml metil jasmonata

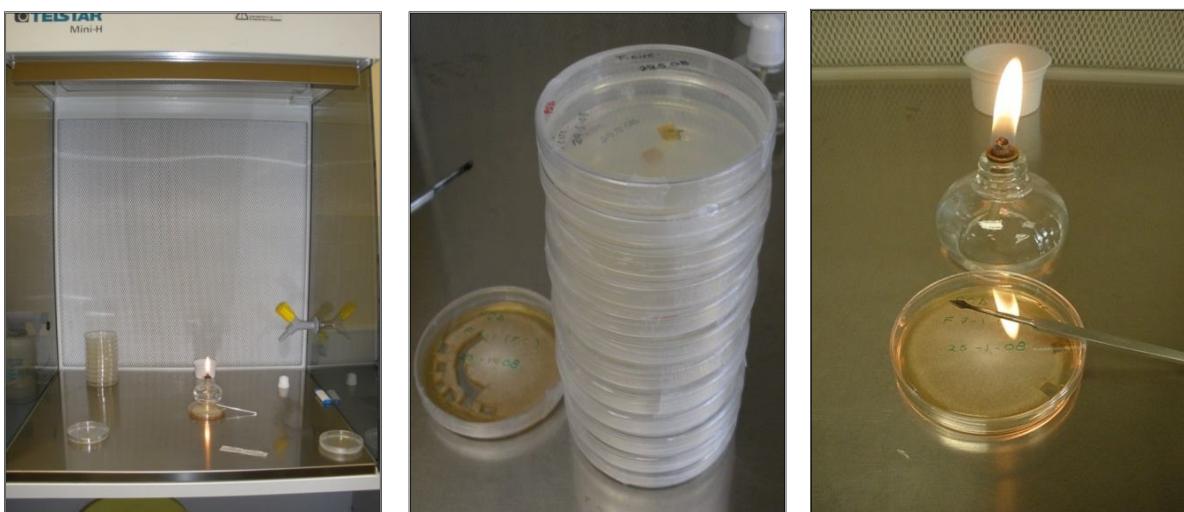


Slika 22: Tween® 20 in 95% metil jasmonat (foto: Vrhovnik M. 2008)

Tween® 20 je emulgator, ki omogoča, da se eterična olja, med katera spada tudi MJ, raztopijo v vodi. Manjše kot so kapljice MJ v destilirani vodi, večja je verjetnost, da bodo rastline skozi listne pore absorbirale pripravljeno raztopino. Je neke vrste detergent, ki se uporablja kot sredstvo za spremembo površinske napetosti na rastlini (surfaktant). S tem je omogočena lažja absorbacija snovi v rastline.

Tretiranje sejank s 25 mM raztopino metil jasmonata je potekalo s pomočjo razpršilca. Vsako sejanko iz bloka II in III smo poškropili iz petih strani. Zgoraj, levo in desno, spredaj in zadaj. Tako smo zagotovili enakomeren nanos. Okularno smo ocenili, če so kapljice na sejankah enakomerno nanešene.

Sledila je priprava čistih kultur *F. circinatum*. Čisto kulturo patogene glive *F. circinatum* (F 7-1, PDA. Vir: Asturias, Izolacija 2005), ki smo jo uporabili za inokulacijo, smo dobili iz fitopatološkega laboratorija Politehnične univerze v Madridu. V laboratoriju smo vzgojili več čistih kultur patogena. V oduhi, ki je bila očiščena z alkoholom, smo pripravili naslednje potrebne inštrumente:



Slika 23: Priprava čistih kultur glive *F. circinatum* v laboratoriju (foto: Vrhovnik M. 2008)

- PDA rastni medij (Patato Dextrose Agar (krompirjev agar) je mikrobiološki medij, narejen iz izvlečkov krompirja in glukoze, in je pogosto uporabljen kot rastni medij za laboratorijsko gojenje kultur gliv in bakterij, ki okužijo žive rastline ali odmirajoči rastlinski material)
- Ogenj

- Skalpel
- Parafilm
- Pisalo

Nad plamenom smo segreli konico skalpela. Tako smo preprečili okužbo čiste kulture patogena glive. Preden smo zarezali v micelij glive, smo skalpel pomočili v PDA medij, da se je ohladili. Nato smo izrezali 1 cm^2 micelija, skupaj z rastnim medijem ter ga nanesli na čisti PDA medij, ki je bil v naprej pripravljen v sterilni petrijevki. Postopek smo večkrat ponovili, da smo dobili dovolj zasnove za razvoj čistih kultur glive, s katerimi smo nato inokulirali 100 sejank (slika 23). Tako pripravljene petrijevke, zatesnjene s parafilmom, smo postavili v hladilnik na konstantno temperaturo 4°C , v temo.

Postopek inokulacije smo izvedli po metodi Dwinell in Barrows-Broaddus, iz leta 1981, ki pravi, da je potrebno sejanke pred inokulacijo raniti. Zato smo vsako rastlino iz bloka II, III in IV ranili. Rastlinam smo 5 cm nad nivojem substrata, na delu sejanke kjer so že prisotne iglice, s skalpelom longitudinalno zarezali ranice, dolge 3-4 mm (slika 24).



Slika 24: Primer ranitve sejanke (foto: Vrhovnik M. 2008)

Nato smo na ranice nanašali kulturo patogene glive. S skalpelom smo iz petrijevke postrgali delček micelija, vzgojene čiste kulture *F. circinatum* ter ga previdno nanesli na rano (slika 25).



Slika 25: Postopek okužbe s patogeno glivo *F. circinatum*; nanos micelija glive na rano (foto: Vrhovnik M. 2008)

Sejank v bloku I, ki so služile za kontrolo, nismo ranili, niti nismo poškropili z raztopino vode in Tweena® 20. Služile so za kontrolo ter za analizo vpliva gnojil na razvoj rastline.

3.3 SPREMLJANJE SIMPTOMOV RAZVOJA BOLEZNI

Po opravljeni okužbi sejank iz bloka III in IV, smo naslednjih 8 tednov spremljali simptome bolezni. Jakost okužbe smo določali s klasifikacijskimi razredi po Muñozu in Ampudia (2005), ki je predstavljena na Preglednici 3.

Preglednica 3: Klasifikacija simptomov bolezni (Muñoz in Ampudia 2005)

Simptom	Opis simptoma
0	Ni znakov okužbe
1	Znaki okužbe vidni, steblo je rahlo rumeno- rjava obarvano
2	Znaki okužbe vidni do 2cm okoli rane, steblo je rumeno-rjava obarvano
3	Znaki infekcije močno vidni, steblo je v celoti porumenelo, vrh je povešen
4	Rastlina je odmrla

Ocene simptomov na inokuliranih sejankah smo beležili v podatkovno tabelo. Spremljanje razvoja bolezni je potekalo tedensko. Sejanke iz bloka I in II, ki niso bile inokulirane s patogeno glivo, smo po treh tednih opazovanja vključili v nadaljnjo raziskavo. Blok III in IV z inokuliranimi sejankami je ostal v rastlinjaku, kjer smo nadaljevali s spremeljanjem razvoja bolezenskih stanj bolezni.

3.4 ANALIZA NEINOKULIRANIH SEJANK

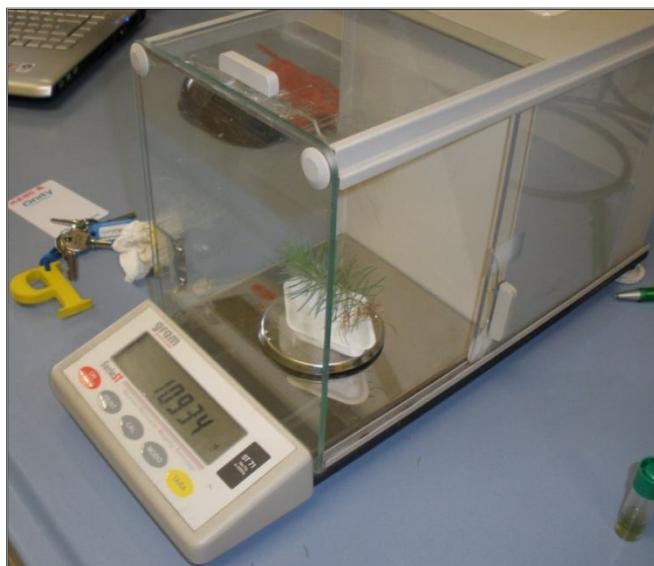
Sejanke, razdeljene v blok I in II, smo prestavili v laboratorij. Namen nadaljne raziskave je bilo ugotavljanje vpliva MJ in različnih koncentracij NPK gnojil na rast in razvoj nadzemnih ter podzemnih delov rastline.

Vsaki sejanki posebej smo izmerili naslednje dele:

- Dolžino in maso steba v soku
- Dolžino in maso zelenega dela sejanke v soku (pod zeleni del sejanke štejemo tisti del, ki je poraščen z iglicami)

- Dolžino, površino in suho maso korenin

Vsako sejanko smo s škarjami odstrigli na nivoju substrata. Steblo smo ločili od zelenega dela rastline. Izmerili smo dolžino stebla in določili maso z umerjeno digitalno tehnico (slika 26). Enako smo storili z zelenim delom rastline.



Slika 26: Merjenje posameznih delov sejank *P. pinaster* z digitalno tehnico (foto: Vrhovnik M. 2008)

Steblo smo nato prerezali na dva dela, zgornji in spodnji. Zgornji del steba smo spravili v epruvetke, ki so vsebovale fiksator FAA (Formalin-Acetic-Alcohol). Volumsko razmerje snovi v fiksatorju je bilo:

formaldehid : ocetna kislina : etanol (70 %) = 1 : 1 : 18

Fiksator FAA je primeren za shranjevanje rastlinskih delov kot so: steba, korenine, oleseneli deli rastlin. Deluje kot močan stabilizator tkiv, saj v njem lahko skladiščimo material tudi več let (slika 27).



Slika 27: Zgornji del steba, shranjen v fiksatorju FAA (foto: Vrhovnik M. 2008)

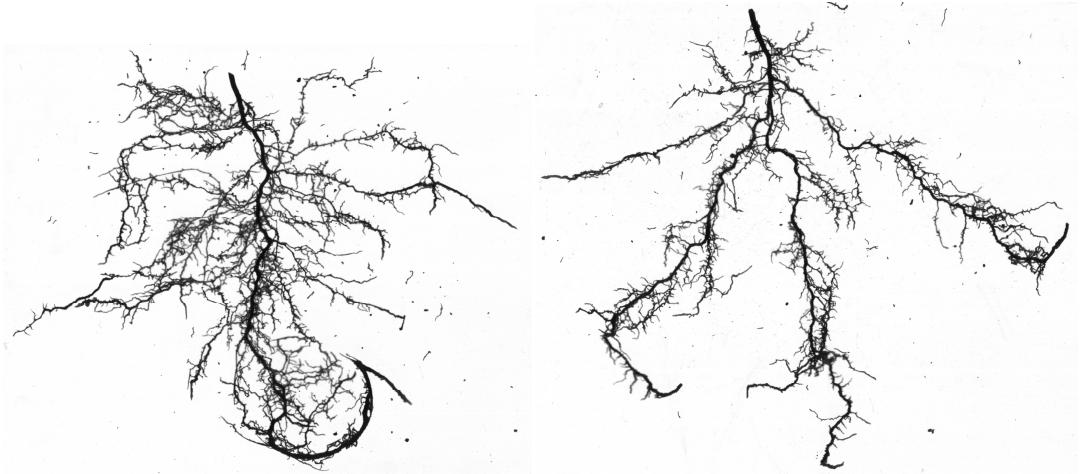
Sledilo je spiranje korenin. Koreninski sistem vsake sejanke smo previdno ločili od substrata, z rahlim spiranjem pod tekočo vodo. Da bi zagotovili kar se da pravilne rezultate, je bilo potrebno iz korenin odstraniti tudi najmanjše kamenčke, ki so se sprijeli s koreninskimi laski. Tako pripravljene korenine smo rahlo osušili s papirjem (slika 28). Sledilo je skeniranje svežih korenin.



Slika 28: Priprava korenin za skeniranje (foto: Vrhovnik M. 2008)

Korenine smo razporedili na ravno površino skenerja (Scanner Epson 100000). S programom Win RHIZO smo izvedli meritve. Dobljene skenirane slike smo shranili za nadaljnjo primerjavo (slika 29). Win RHIZO je avtomatični ter interaktivni sistem za

analizo slik, zasnovan posebej za merjenje korenin. Poleg osnovnega merjenja površin, dolžin in debelin, program zaznava tudi morfologijo, relief, strukturo, barvo in bolezenska stanja korenin. Dobljene rezultate smo shranili v podatkovno tabelo.



Slika 29: Primeri skeniranih korenin sejank *P. pinaster* (foto: Vrhovnik M. 2008)

Izmerjene sveže korenine smo shranili v papirnate vrečke, jih označili s številkami sejank, katerim so korenine pripadale ter jih postavili v sušilnico. Sušenje je potekalo sedem dni, na temperaturi 40 °C in potem še naslednjih 24 ur, na temperaturi 65 °C. Nato smo izmerili suho maso korenin (slika 30).



Slika 30: Primer papirnatih vrečk, v katerih smo sušili korenine *P. pinaster* (slika levo) ter korenine primerne za merjenje suhe mase snovi (slika desno) (foto: Vrhovnik M. 2008)

Sledila je analiza steba. Zanimala nas je vsebnost smolnih kanalov v posamezni sejanki. Zgornje dele stebel, ki smo jih skladiščili v FAA fiksatorju, smo uporabili za pripravo mokrih preparatov.

Z britvico smo odrezali čim tanjšo rezino stebelnega tkiva ter ga s pinceto prenesli v kapljico destilirane vode na objektivnem steklu. Preparat smo pokrili s krovnim stekelcem ter ga postavili pod mikroskop. Na okular mikroskopa smo nastavili fotoaparat znamke Canon. Z objektivom z 10 kratno povečavo, smo poslikali tkiva. (slika 30). Na podlagi dobljenih slik okularno določili število smolnih kanalov v vsakem prerezu (priloga A).



Slika 31: Slika tkiva pridobljena na mikroskopu s fotoaparatom Canon (foto: Vrhovnik M. 2008)

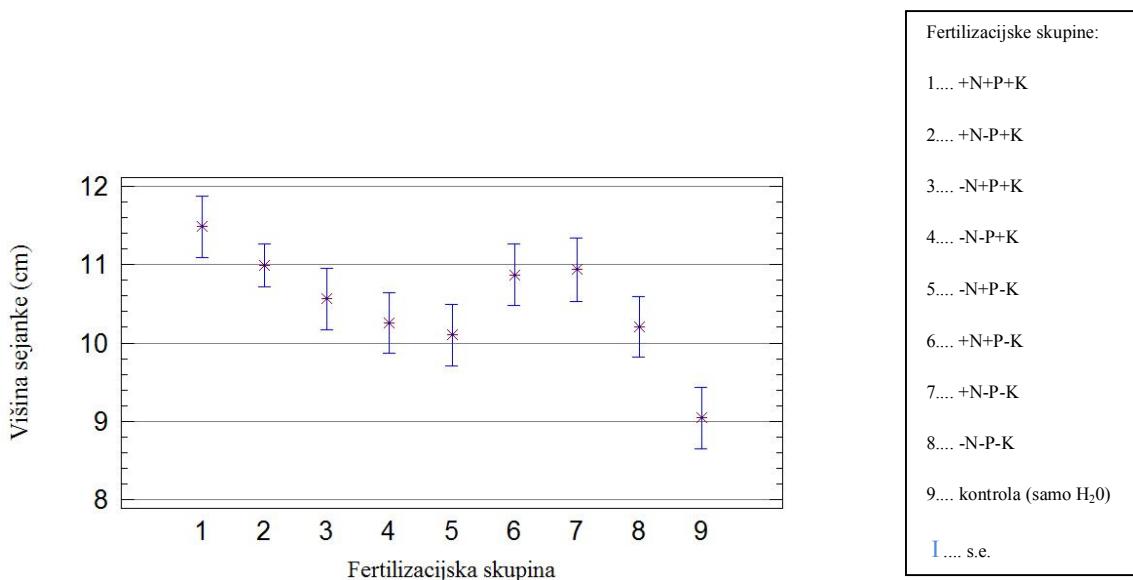
Sledila je statistična obdelava podatkov. Ugotavliali smo vpliv natrija, kalija in fosforja na rast in razvoj sejank, ki so bile samo inokulirane z *F. circinatum* ter vpliv gnojil na sejanke, ki so bile inokulirane s patogeno glivo ter predhodno tretirane z MJ. Zanimalo nas je tudi, če obstaja statistično značilna razlika med sejankami, ki so tretirane z MJ ter tistimi, ki niso, na dovzetnost za patogeno glivo *F. circinatum*. Poleg tega nas je zanimalo, kakšen vpliv ima različna koncentracij NPK gnojil ter MJ na odpornost rastline na patogeno glivo. Mogoče obstajajo statistično značilne razlike, med količino smolnih kanalov, pri tretiranih in netretiranih sejankah z MJ.

4 REZULTATI

4.2 VPLIV NPK GNOJIL NA RAZVOJ SEJANK

Za analizo vpliva različnih koncentracij NPK gnojil na razvoj sejank, smo uporabili program Statgraphics Plus, s katerim smo izvedli ANOVA test. Uporabili smo meritve sejank, predno smo jih tretirali z MJ. Vzorec je vseboval 199 sejank, razdeljenih v devet različnih fertilizacijskih skupin.

One-way ANOVA test kaže statistično značilne razlike vplivov 9 različnih fernalizacijskih skupin na višino sejanke. Sejanke iz skupine S1, t. s. sejanke, ki smo jim dodajali vsa hranila, so bile najvišje (11,49 cm). Sejanke iz kontrolne skupine S9, so bile v povprečju najmanjše (9,04 cm). Velikosti skupin S7, S6 in S2 so se gibale med 10,87 cm in 10,99 cm. Sejanke S8, S5, S4 in S3 pa med 10,11 cm in 10,57 cm.



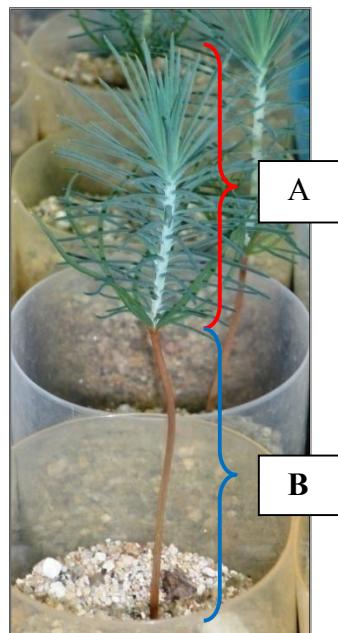
Slika 32: Vpliv NPK skupin na višino sejanke

Največ vpliva na velikost sejank ima element dušik, saj so vse sejanke iz skupin, v katerih smo substratu dodajali dušik (S1, S6, S7), najvišje. Sledile so sejanke, ki so v substratu vsebovale kalij v kombinaciji z dušikom (S2). V skupini S3, kjer smo dodajali kombinacijo fosforja in kalija, brez dušika, so sejanke zrastle višje kot v skupini S5, kjer smo dodali

samo fosfor. V povprečju so poleg kontrolne skupine S9 dosegle najnižjo višino sejanke v skupini S8, kjer dušika, fosforja in kalija nismo dodali, ter v skupini S5, kjer smo dodali samo fosfor (slika 32).

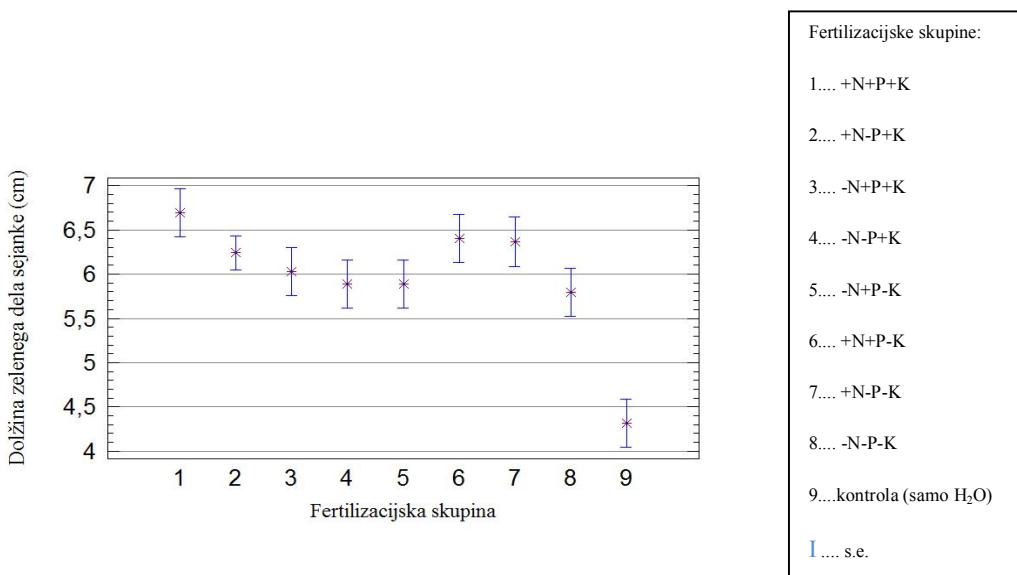
Če primerjamo vpliv posameznih elementov NPK gnojil na višino rastline, ugotovimo, da ima največji vpliv na višino sejank dušik. Kombinacija vseh treh elementov je vplivala na najvišjo rast sejank (11,49 cm). Sledila je kombinacija N in K (10,99 cm).

Sejankam smo poleg celotne višine posebej izmerili dolžino zelenega dela sejanke ter dolžino steba (slika 33).



Slika 33: Delitev sejanke na dolžino A) zelenega dela ter dolžino B)steba (foto: Vrhovnik M. 2008)

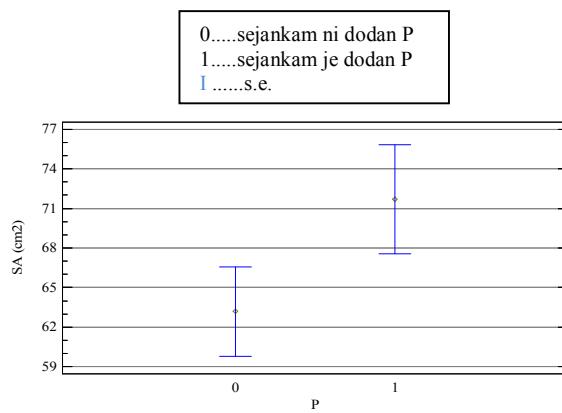
Pokazale so se statistično značilne razlike v višini zelenega dela rastline, glede na fertilizacijske skupine (slika 34).



Slika 34: Višina zelenega dela sejanke glede na fertilizacijske skupine

Sejanke v kontrolni skupini so imele najkrajšo dolžino zelenga dela (4,32 cm), v skupini S1 pa so imele sejanke zeleni del najdaljši (6,70 cm). Pri sejankah, ki v substratu niso imeli dodanega dušika, skupine S8, S3, S4 in S5, se je zeleni del z iglicami razvil do dolžine med 5,80 cm (S8) in 6,03 cm (S3). Sejanke v skupinah z vsebovanim dušikom so zelene dele razvile od dolžine 6,24 cm (S2) cm do 6,70 cm (S1).

Vsebnost dušika najbolj vpliva na dolžino zelenega dela. Razlike med sejankami, ki v substratu imajo N in tistimi, ki ga nimajo, so očitne. Največji zeleni del so razvile sejanke, ki so rastle v substratu, v katerem je bila kombinacija vseh treh elementov (6,70 cm). Sledijo jim sejanke s kombinacijo N in K v substratu (6,40 cm). Kombinacija N in P je vplivala na krajše razvite zelene dele sejanke (6,24 cm), kot če je bil v substrat dodan samo N (6,36 cm).



Slika 35: Vpliv fosforja na površino koreninskega sistema

Fosfor je pri sejankah, ki so bile tretirane z MJ, vplival na razvoj koreninskega sistema (slika 35). Sejanke, ki so imele dodan hranilni element fosfor, so imele večjo površino plašča (SA) koreninskega sistema. Srednje vrednosti SA koreninskega sistema tretiranih sejank, ki so imele dodan fosfor v substratu, so bile $61,82 \text{ cm}^2$ ter $52,22 \text{ cm}^2$ pri sejankah kjer fosfor ni bil dodan.

4.2 VPLIV METIL JASMONATA NA ANATOMSKE SPREMEMBE V RASTLINI

Po zbiranju podatkov, ki smo jih analizirali v zgoraj opisanih raziskavah, smo sejanke ločili v 4 bloke. Sejanke v bloku II, III in IV smo ranili, nato smo blok II in III tertirali z MJ, blok III in IV pa smo inokulirali s patogeno glivo *F. circinatum*.

Že po enem tednu so se pokazale vizualne razlike med sejankami, ki so bile, in tistimi, ki niso bile tretirane. Vrhovi tretiranih sejank so postali bolj svetlo zeleni, iglice so se na konicah rahlo ukrivile, kot da bi prenehale rasti (slika 36). Deformacija vršičkov je bila jasno vidna, na dotik so bili bolj lepljivi in zbiti.

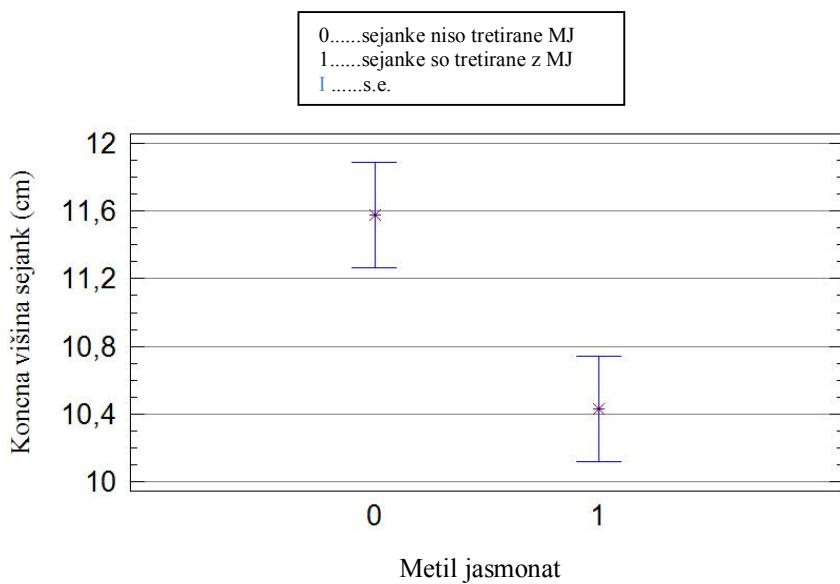


Slika 36: Vizualna primerjava rastnih vršičkov netretiranih (slika levo) in tretiranih sejank z MJ (slika desno) (foto: Vrhovnik M. 2008)

Vzrok spremenjene barve vršičkov je lahko inducirana senescenca v rastlini zaradi tertiranja z MJ. Senescenca se lahko izraža v zmanjšani sintezi klorofila v iglicah in posledično v spremembi barve. Ukrivljanje konic iglic in smolenje so lahko tudi posledica toksičnega delovanja MJ zaradi prevelike koncentracije.

V nadaljevanju smo se osredotočili, kako vpliva MJ na razvoj sejank. Zanimalo nas je, če obstajajo statistično značilne razlike vpliva MJ na končno višino rastlin ter dolžino in maso posameznih delov kot so steblo, zeleni del ter korenine. V to analizo smo vključili blok I, ki je služil kot kontrola ter blok II, ki je bil tertiran z MJ. Skupaj 99 sejank. Rezultate prikazuje slika 37.

Tudi v tem poskusu smo izvedli One-way ANOVA test. Izkazalo se je, da obstajajo statistično značilne razlike med končno višino sejank, ki so tretirane z MJ ter sejankami, ki niso tretirane z njim.

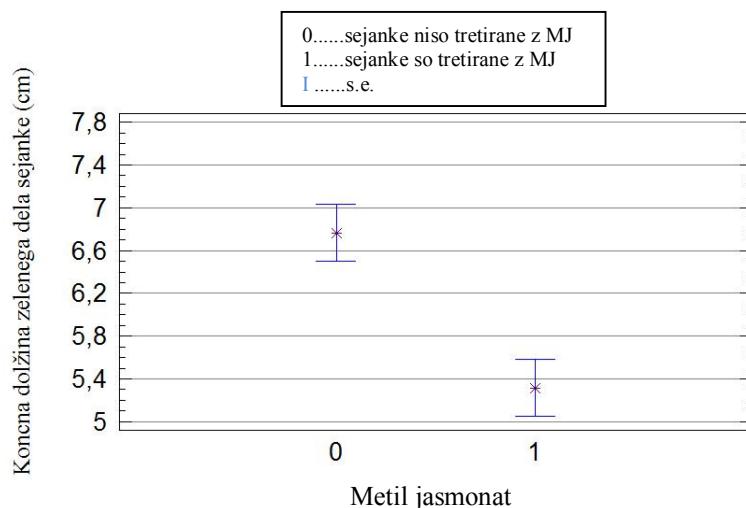


Slika 37: Vpliv metil jasmonata na končno višino sejank

Sejanke v bloku I, ki niso bile tretirane z MJ, so dosegle višjo končno višino (11,56 cm) kot sejanke, ki so bile tretirane z MJ (10,43 cm). Tu se postavi vprašanje, ali na tako razliko res vpliva MJ ali pa ima večji vpliv ranitev, ki smo jo izvedli na vseh sejankah v bloku II. Za ta odgovor bi morali imeti kontrolni vzorec netretiranih in ranjenih sejank, ki ga žal nismo imeli.

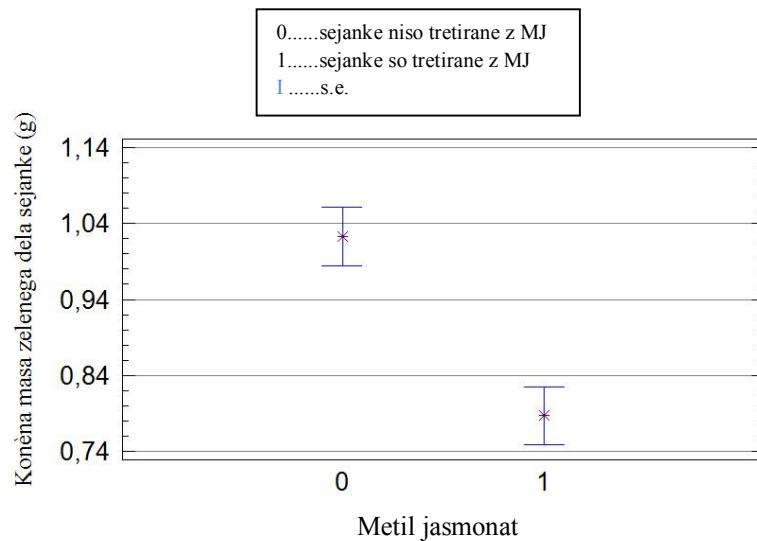
Zato smo v nadaljevanju upoštevali, da imata MJ in ranitev skupni učinek na sejanko. Ugotavljali smo vpliv ranitve in tretiranja sejank z MJ na rast in razvoj rastline.

Vpliv ranitve in MJ na dolžino zelenega dela sejanke kaže statistično značilne razlike (slika 38). Sejanke iz bloka I so razvile daljši zeleni del rastline (6,78 cm), kot sejanke iz bloka II (5,31 cm).



Slika 38: Vpliv ranitve in metil jasmonata sejank na končno dolžino zelenega dela rastline

Primerjava končne dolžine stebel sejank v bloku I in II, ni pokazala statistično značilnih razlik. Zaznali smo razlike v masi zelenega dela med sejankami v bloku I in II (slika 39).

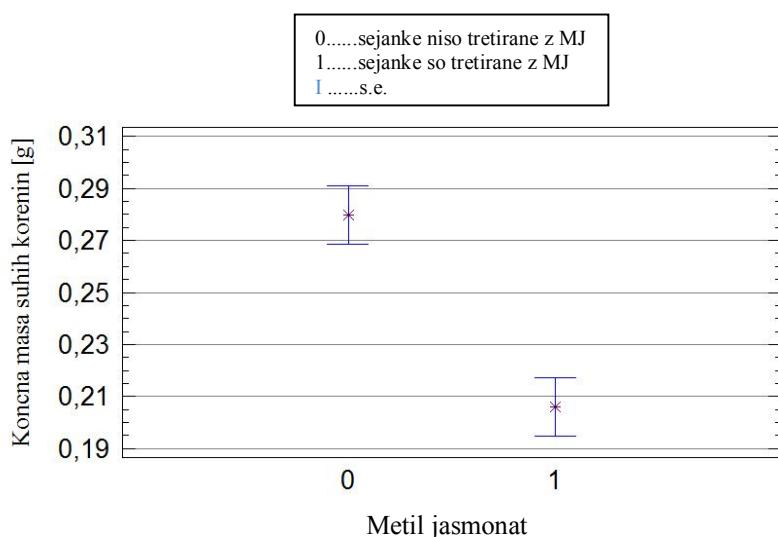


Slika 39: Vpliv ranitve in metil jasmonata na maso zelenega dela sejanke

Masa zeleneih delov sejank v bloku I je dosegla višje vrednosti. Zeleni deli sejank so v povprečju tehtali 1,02 g, v bloku II pa 0,79 g.

V masah stebel med blokom I in II ni bilo statistično značilnih razlik.

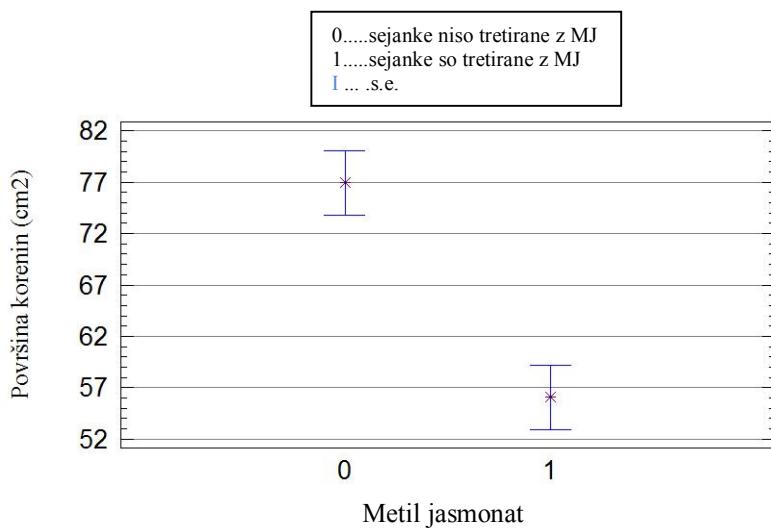
Zaznali smo tudi statistično značilne razlike v koreninskem sistemu sejank (slika 40). Sejanke v bloku I so razvile večji koreninski sistem. Primerjava mase suhih korenin kaže razlike med blokoma. V bloku I so imele sejanke povprečno maso 0,28 g, sejanke tretirane z MJ in ranjene, so v povprečju razvile koreninski sistem z maso 0,21 g.



Slika 40: Vpliv ranitve in metil jasmonata na maso suhih korenin

Razlike so se pojavile tudi v površini koreninskega sistema (slika 41). Površina korenin je bila izmerjena s programom WinRIZO. Na podlagi skeniranih koreninskih sistemov sejank bloka I in II, smo z omenjenim programom določili projekcijsko površino korenin (PA) ter dolžino in površino plašča korenin (SA). Sejanke v bloku I so imele večjo SA korenin kot sejanke v bloku II.

Povprečna površina plašča korenin netretiranih in nepoškodovanih sejank je znašala 76,95 cm² medtem, ko so sejanke v bloku II razvile povprečno 56,06 cm² plašča korenin. Če primerjamo PA korenin, dobimo enak rezultat. Sejanke iz bloka I imajo večjo PA kot sejanke iz bloka II.



Slika 41: Vpliv ranitve in metil jasmonata na površino plašča korenin (SA)

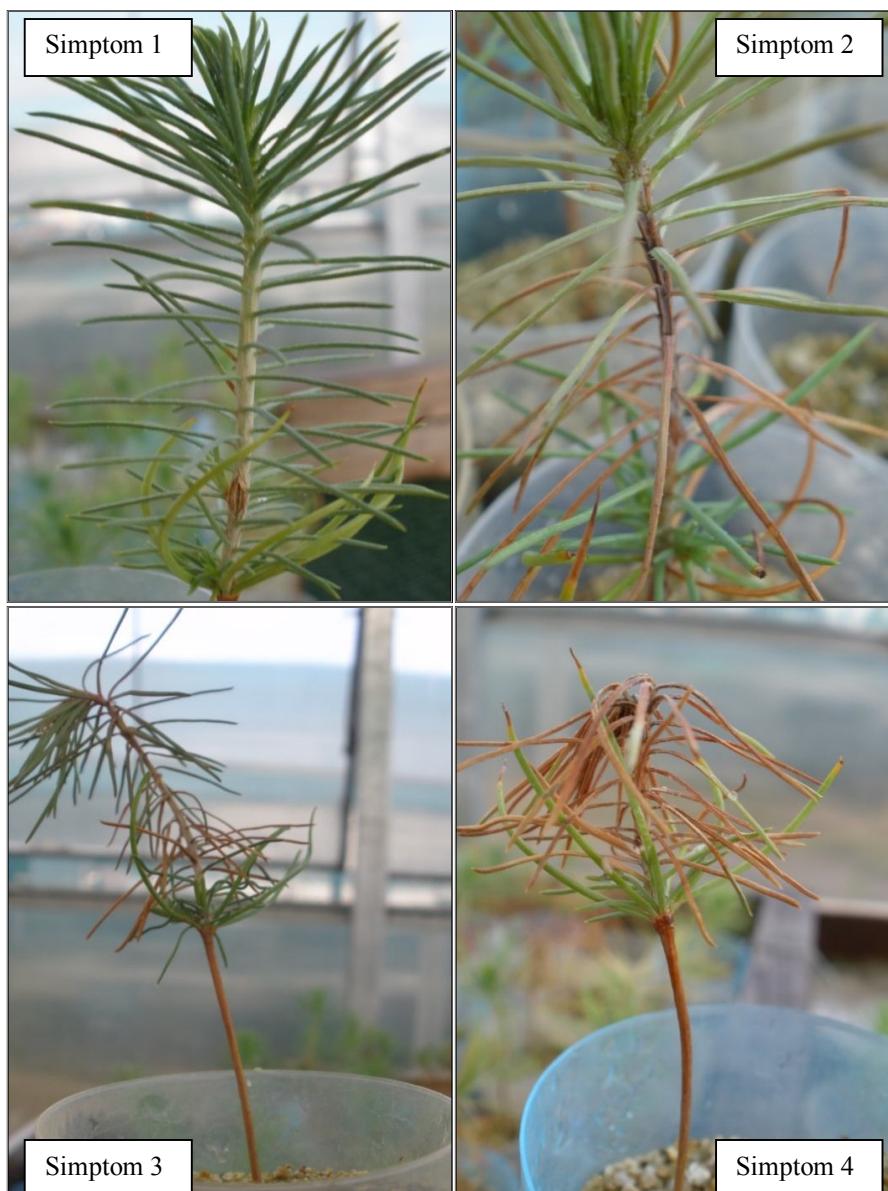
V dolžini korenin med različnimi fernalizacijskimi skupinami razlik nismo ugotovili.

Pri analizi tkiv smo primerjali količino smolnih kanalov v sejankah bloka I in II. Skušali smo izvedeti, ali smo z ranitvijo in tretiranjem z MJ vplivali na povečano količino smolnih kanalov v posamezni sejanki. Na podlagi dobljenih slik in poznavanju celičnih struktur smolnih kanalov, smo določili število v posamezni sejanki. Izkazalo se je, da razlik v količini smolnih kanalov v sejankah bloka I in II ni bilo. Vse sejanke so povprečno vsebovale 10 smolnih kanalov. Ocene so zgolj vizualne in niso popolnoma zanesljive, saj so bili prerezi tkiv različnih debelin. To je lahko vplivalo na količino vidnih smolnih kanalov.

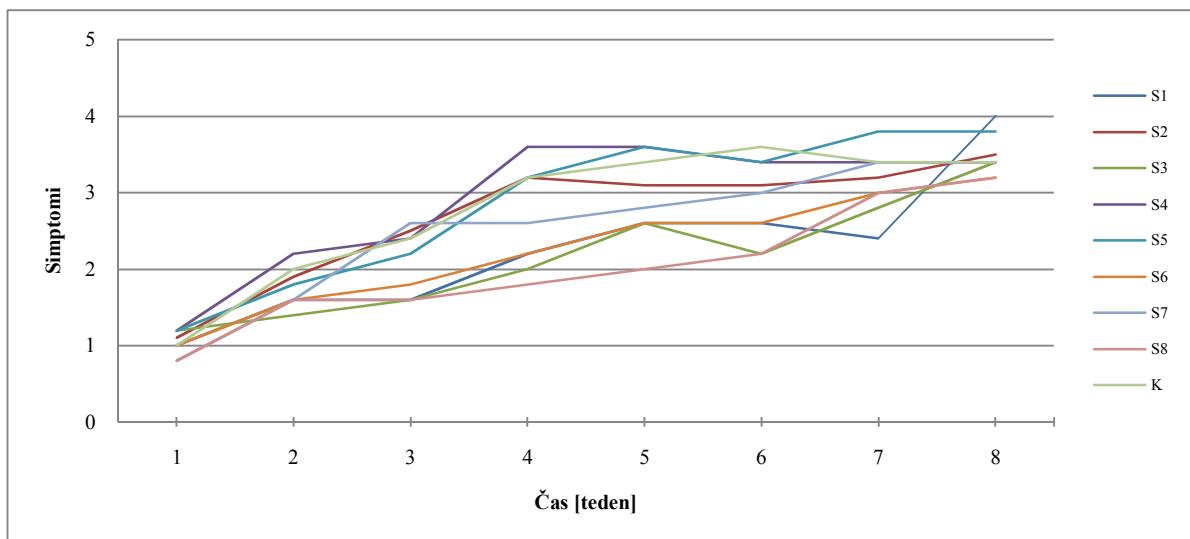
Iz zgornjih primerjav lahko sklepamo, da je ranitev sejank in tretiranje z MJ vplivalo na razvoj sejank. Sejanke v bloku II so prvi stres doživele z ranitvijo, drugi stres pa s tretiranjem z MJ. Odziv rastline na ranitev, tretiranje rastlin z MJ ter inokulacijo s patogeno glivo je lahko preusmeritev energije v odgovor rastline na stres in ne v razvoj koreninskega ali asimilacijskega sistema. Sejanke v bloku I niso doživele dodatnih stresov, zato so nemoteno razvijale korenine in asimilacijsko tkivo.

4.3 RAZVOJ SIMPTOMOV IN SMRTNOST SEJANK ZARADI *Fusarium circinatum*, GLEDE NA VSEBNOST NPK GNOJIL V SUBSTRATU TER TRETIRANJE Z METIL JASMONATOM

Po inokulaciji sejank smo 8 tednov spremljali razvoj simptomov bolezni na okuženih sejankah v bloku III in bloku IV. Kriterij ocenjevanja simptomov smo povzeli po avtorjih Muñoz in Ampudia (2005).



Slika 42: Izgled simptomov kategoriziranih po Muñoz in Ampudia, 2005 (foto: Vrhovnik M. 2008)



Slika 43: Razvoj simptomov sejank v bloku III

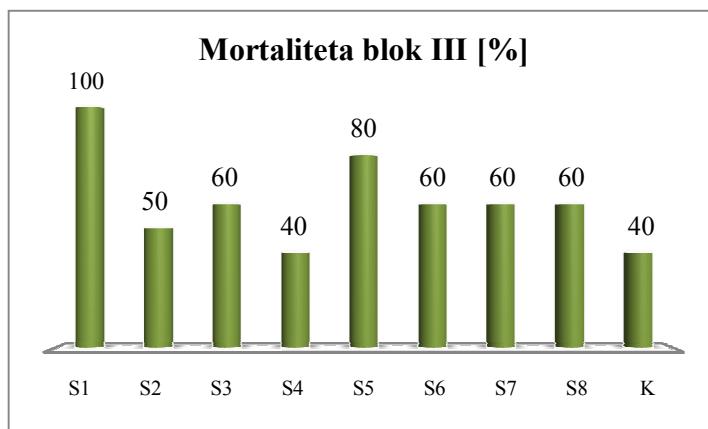
Sejanke v bloku III so bile tretirane z MJ. Najhitrejši razvoj simptomov v bloku III se je pokazal na sejankah, ki so spadale v skupino S4. To je skupina, ki smo ji dodajali samo kalij. Že prvi teden po okužbi je imelo največ sejank prve znake okužbe, steblo je začelo rahlo rumeneti. V drugem tednu se je okužba razširila do 2 cm okoli rane, že v četrtem tednu so bili znaki okužbe močno vidni. Vrhovi sejank so se povesili. Kasneje se je stanje sejank nekoliko izboljšalo na račun novonastalih poganjkov pod mestom okužbe. Dokaj hitro so se simptomi razvijali na sejankah iz kontrolne skupine ter S5 (dodan samo P) in S7 (dodan samo N). Simptomi okužbe so se na prehodu iz 2. v 3. teden širili do 2 cm okoli rane, v 4. tednu je imela večina sejank skupin S5, S6 in S7 povešene vrhove v celoti porumenela steba.

Zanimivo je dejstvo, da so si nekatere rastline skozi čas opazovanja simptomov nekoliko opomogle. V okolici mesta okužbe so pognali speči poganjki tako, da je sejanka kljub temu, da je bil vršni poganjek posušen, še vedno kazala znake življenja in se na ta način borila proti okužbi (slika 44).



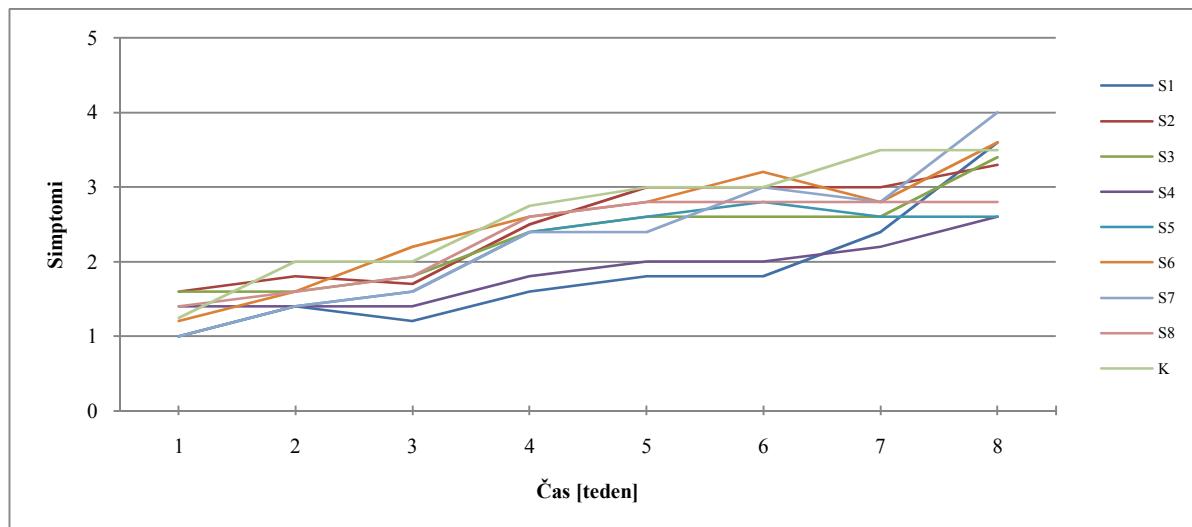
Slika 44: Primer sejanke, ki so se ji pod mestom okužbe pričeli razvijati speči poganjki (foto: Vrhovnik M. 2008)

S časoma se je lahko zmanjšal znak okužbe pri posamezni sejanki. To smo v 5. tednu opazovanja opazili pri sejankah v skupini S3, S4, S5 in K. Tudi sejankam v skupini S1 so se znaki okužbe nekoliko zmanjšali na račun rasti novih poganjkov, nato je sledil razvoj simptomov, ki so se končali s 100 % smrtnostjo sejank. Ravno tako je sejankam skupine S5 po okrevanju sledilo povečanje simptomov bolezni. Na koncu opazovanja je odmrlo 80 % sejank. Največ preživelih sejank je bilo v skupini S4 (dodan samo K) in v kontrolni skupini. Odmrlo je le 40% sejank. V skupinah S3, S6, S7 in S8 je odmrlo 60 % sejank.



Slika 45: Smrtnost sejank v bloku III po 8. tednu opazovanja

V bloku IV, kjer so bile sejanke samo inokulirane s patogeno glivo *F. circinatum*, je razvoj simptomov potekal, kot kaže graf (slika 46).

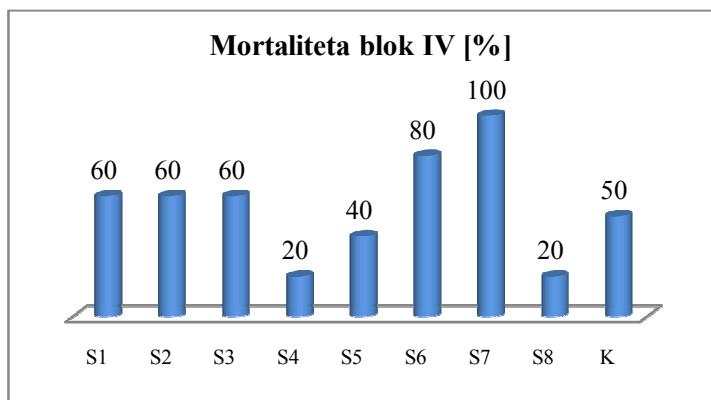


Slika 46: Razvoj simptomov na sejankah v bloku IV

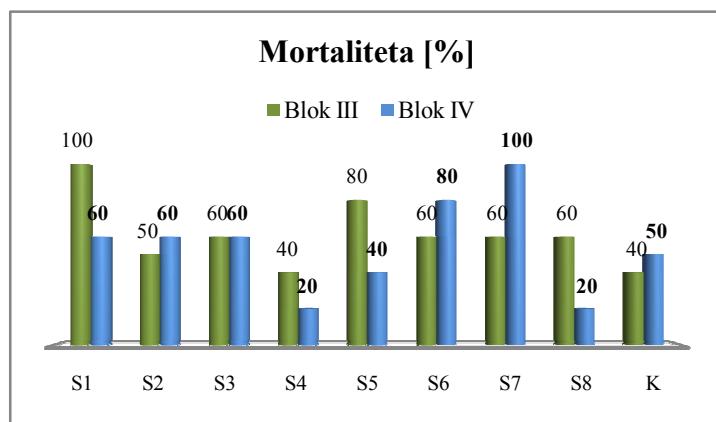
Že po prvem tednu so se znaki okužbe pokazali na vseh sejankah. Najmanj simptomov so imele sejanke iz skupine S7 (dodan samo N), največ pa sejanke iz skupine S3 (dodana P in K) in S2 (dodana N in K). V drugem tednu so se na sejankah iz kontrolne skupine povečali znaki okužbe do 2 cm okoli rane, spremembe na ostalih sejankah niso bile tako očitne. V tretjem tednu je izstopala skupina S6 (dodana N in P), v kateri so sejanke vidno slabele. Ko smo primerjali razvoj simptomov v četrtem tednu med blokom III in IV, smo ugotovili, da je razvoj simptomov v bloku IV počasnejši. Nobena sejanka še ni imela v tem času povešenih vrhov ter popolnoma porumenelega steba. Šele v petem tednu so bili znaki okužbe zelo očitni. Vrhovi so se povesili sejankam iz skupine S2 (dodan N in K) in iz kontrolne skupine. Simptomi bolezni na ostalih sejankah so bili rumenenje do 2 cm okoli rane. Povešanje vrhov večine sejank se je pričelo šele med šestim in osmim tednom opazovanja. To velja za sejanke v skupinah S2, S3, S1, S6, S7 in K. Tudi v tem bloku smo zaznali nekaj izboljšanja pri vmesnem stanju, rast specih poganjkov, ter nato nadaljnji razvoj simptomov bolezni, zlasti v skupinah S6 (dodana N in P), S7 (dodan N) in S5 (dodan P).

Smrtnost sejank po osmih tednih opazovanja razvoja bolezni smo podali v odstotkih. Za ta način smo se odločili zaradi neenakega števila sejank v skupinah. V vseh skupinah je bilo po 10 sejank, razen v skupini S2, kjer je bilo sejank 20. Vemo, da se pri tako majhnem vzorcu podatkov ne podaja v odstotkih. Tako smo lahko izvedli primerjavo med skupinami.

Kontrolna skupina je v zadnjem tednu kazala najmočnejša znamenja okužbe, vendar je bila končna smrtnost sejank le 50 %. V skupini S7 (dodan N) je odmrlo 100 % sejank. Najmanj sejank je odmrlo v skupinah S4 (dodan K) in S8 (ni dodanih NPK), to je 20 %. Sejanke v skupinah S1, S2 in S3 so imele v osmem tednu vidne znake okužbe ter povešene vrhove, smrtnost je bila 60 %. Veliko sejank je podleglo okužbi v skupini S6 (dodana N in K), saj je preživelilo le 20 % sejank, pa še te z zelo izraženimi znaki okužbe (slika 47).

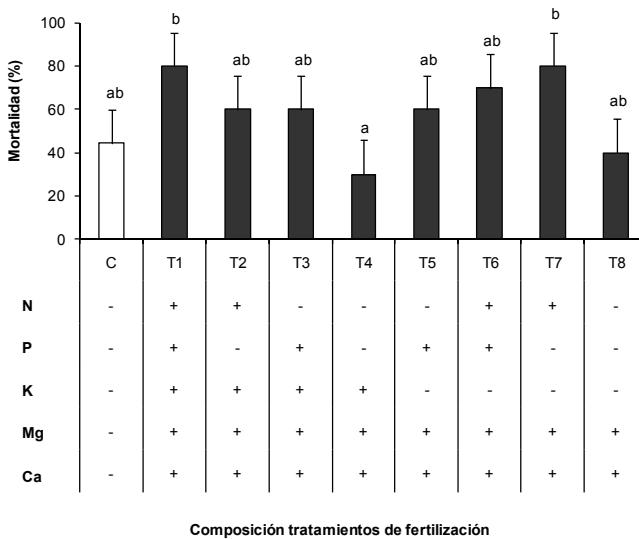


Slika 47: Smrtnost sejank v bloku IV po 8.tednu opazovanja



Slika 48: Primerjava mortalitet bloka III in bloka IV

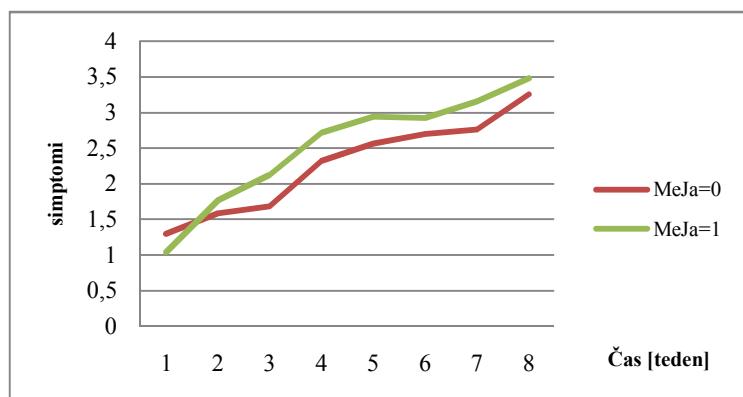
Na koncu opazovanja je prišlo do številčnih razlik odmrlih sejank v bloku III in IV (slika 48). Razlika je bila sicer majhna. V bloku III je odmrlo 60 % vseh sejank, v bloku IV pa 55 % vseh sejank. Obstajajo zanimive razlike znotraj skupin. Sejanke, ki so bile tretirane z MJ in smo jim dodajali vse tri glavne hranilne elemente, so v celoti odmrle (S1). Smrtnost netretiranih sejanke enake fertilizacijske skupine je bila 60%. Razvidno je, da dodani dušik vpliva na količino odmrlih rastlin. Vse fertilizacijske skupine, ki so vsebovale dušik, so dosegle mortaliteto 50 % in več (S1, S2, S6, S7).



Slika 49: Smrtnost sejank glede na fertilizacijsko skupino. Fertilizacijske skupine so enake, le oznake so različne (C=K, T1=S1, T2=S2, T3=S3, T4=S4, T5=S5, T6=S6, T7=S7, T8=S8, T9=S) (Vir: Vivas in sod. 2009).

Slika 49 prikazuje fertilizacijske skupine ter stopnjo mortalitete v vsaki skupini. Tudi tu je razvidno, da je v skupinah, kjer je dodan dušik, statistično značilna razlika in je stopnja mortalitete največja. V našem primeru je to skupina S1 in S7. Odmrlo je kar 80 % sejank. V nasprotju je pri sejankah, ki smo jim dodajali samo fosfor, prišlo do najmanjše mortalitete (S4).

Primerjava razvoja simptomov med sejankami, ki so bile tretirane z MJ in inokulirane z *F. circinatum*, ter tistimi, ki so bile samo inokulirane, prikazuje grafikon (slika 50).



Slika 50: Časovni razvoj simptomov tretiranih in netretiranih sejank

Odpornost sejank, ki so bile tretirane z MJ, se je v prvem tednu opazovanja povečala, saj so bili simptomi na tretiranih sejankah manj izraziti kot na netretiranih. Nato se je vpliv metil jasmonata zabrisal oz. nasprotno, tretirane sejanke so bile podvržene hitrejšemu razvoju simptomov bolezni v vseh preostalih tednih opazovanja. Tu ne moremo trditi, da je ravno metil jasmonat vplival na povečano smrtnost sejank. Da bi preverili učinek emulgatorja Tween® 20 na sejanke, bi morali kontrolni blok poškropiti z raztopino vode in emulgatorja. Tako bi lahko preverili, če ima vpliv na sejanke.

5 RAZPRAVA

5.1 VPLIV NPK GNOJIL NA RAZVOJ SEJANK *Pinus pinaster* TER ODPORNOST PROTI PATOGENI GLIVI *Fusarium circinatum*

Dušik, skupaj z fosforjem in kalijem, predstavlja osnovne elemente, pomembne za rast in razvoj rastlin. Rezultati so pokazali, da dušik vpliva na razvoj nadzemnega dela rastline, fosfor pa na površino koreninskega sistema. Znano je, da dušik povzroči hitrejše deljenje in rast celic, kar povečuje skupno biomaso rastline (Mattson 1980). Nohrstedet (2001) je opazil, da je bil dušik, ki je bil rastlinam dodan posamično, v primerjavi s kalijem in fosforjem, edino gnojilo, ki je izzvalo povečano rast rastlin.

Smolni kanali navadno oblikujejo obrambne bariere proti herbivorom in patogenim organizmom. V našem poskusu nismo ugotovili, ali produkcija travmatskih smolnih kanalov spada v obrambni odziv rastline proti patogeni glivi *F. circinatum*. Je pa znano, da je okužba z glivo poškoduje celice smolnih kanalov tako, da je produkcija smole onemogočena (Barrows-Broaddus in Dwinell 1983).

Okularna primerjava tkivnih preparatov ne kaže značilnih razlik v številu smolnih kanalov med sejankami različnih fertilizacijskih skupin. Obstajajo študije, ki pravijo, da je število smolnih kanalov manjše, če je rastlini na voljo več hrani (Vanakker in sod. 2004, Moreira in sod. 2008). Imeli smo premajhno število sejank (n=10) posamezne fertilizacijske skupine, da bi lahko zaznali razlike v številu smolnih kanalov med skupinami. Napake so se lahko pojavile že pri tehniki priprave preparatov, saj so bile debeline prerezov različne. Debelejši kot je preparat, slabša je prepoznavna tkivna struktura.

Rosner in Hannrup (2004) navajata, da ima pri produkciji smolnih kanalov večjo vlogo genetski vpliv kot okoljski. Ker smo pri našem poskusu uporabili semena enega drevesa, to najverjetneje poleg premajhnega vzorca, močno vpliva na dobljeni rezultat.

Ko smo ugotavljali ali posamezni elementi vplivajo na mortaliteto sejank *P. pinaster* zaradi patogene glive, smo ugotovili, da dušik mortaliteto zvišuje. Je glavni element, ki vpliva na večjo smrtnost, medtem ko imata dodani kalij in fosfor v kombinaciji z dušikom enak učinek. Predhodne raziskave so pokazale, da prevelika količina dušika zmanjšuje

obrambne sposobnosti rastlin v primeru napada določenih patogenih organizmov. Dodajanje anorganskega gnojila, ki vsebuje dušik, je povzročilo večjo škodo zaradi *F. circinatum* na plantažah *Pinus elliotti*. Povečala se je smrtnost in nastale so številne nepravilnosti v rasti dreves (Fisher in sod.1981; Fraederich in Witcher, 1982). Fraederich in Witcher (1982) v podobnih študijah ugotavlja, da je pri sejankah *Pinus virginiana*, ki so bile gnojene z dušikom v kombinaciji s fosforjem in kalijem, večja verjetnost pojava padavice klic kot pri tistih, ki dušika niso prejemale. Bloomberg (1981) ravno tako pravi, da velika koncentracija dušika v prsti poveča smrtnost sejank zaradi patogene glive *Fusarium oxysporum*. Tudi druge glive, kot je npr. *Gremmenilla abietina*, so v primeru, da je prst bogata z dušikom, bolj agresivne do gostitelja (Sairanen, 1990). Zato avtorji, kot je Sinclair in sod. (1995) predlagajo, da lahko z primernim gnojenjem omejujemo razvoj patogenih gliv kot je npr. *F.oxysporum*, *F.circinatum*...

Kot obrazložitev povečane dovzetnosti sejank *P. pinaster* na patogeno glivo *F.circinatum*, lahko zapišemo naslednje hipoteze: (1) za uspešno okužbo gostitelja s patogeno glivo so potrebna hranila, ki jih vsebuje gostiteljska rastlina v tkivu. Zato povečan dušik v tkivu rastline predstavlja bolj ustrezno in za glivo bolj bogato okolje (Snoeijers in sod. 2000) in (2) v rastlinah povečana dostopnost gnojil spremeni razporeditev energije v rastlini, kar lahko vpliva na jakost obrambnega mehanizma rastline. Herms in Mattson (1992) ugotavlja, da imajo počasi rastoče rastline na razpolago več energijskih virov, ki jih v primeru napada lahko usmerijo v obrambni mehanizem, kot hitro rastoče rastline. Tako imenovano ravnotežje med rastjo in diferenciacijo celic pravi, da obstaja ravnovesje med rastjo in sekundarnim metabolizmom, ki ga rastlina uravnava z omejevanjem rasti celic. V naši študiji je dodajanje dušika vplivalo, da se je ravnovesje pomaknilo v prid rasti sejank, in ne v proizvodnjo sekundarnih metabolitov, ki bi zavirale razrast patogena v rastlini. S temi ugotovitvami je prva hipoteza, da so sejanke, ki so rastle v okolju z zelo bogato količino hranilnih snovi manj odporne na patogeno glivo, bolj verjetna.

5.2 VPLIV METIL JASMONATA NA RAZVOJ SEJANK *Pinus pinaster* TER ODPORNOST PROTI PATOGENI GLIVI *Fusarium circinatum*

Naša hipoteza je bila, da so sejanke, ki so tretirane s sintetično pridobljenim estrom jasmonske kisline, bolj odporne na patogeno glivo *F. circinatum*. Rezultati so pokazali nasprotno. Izkazalo se je celo, da je tertiranje z metil jasmonatom povzročilo hitrejši razvoj boleznskih stanj. Vzrok temu lahko pripisemo premajhnemu vzorcu ter genetski enoličnosti semen. Obstaja tudi možnost, da smo na sejanke nanesli preveliko koncentracijo metil jasmonata (koncentracija je bil 25 mM), saj smo kmalu po nanosu opazili, da se tretirane sejanke drugače razvijajo. Prišlo je do rahle spremembe barve, sejanke so postale bolj svetlo zelene, vršički so prenehali rasti, na dotik so postali rahlo smolasti. Spremembe rastlin lahko pripisujemo toksičnemu delovanju metil jasmonata. Pri analizi podatkov se je porodilo vprašanje, ali je na sejanke vplival tudi emulgator Tween® 20. Tween® 20, sinonim polisorbat, je surfaktant, ki omogoča raztopljanje eteričnih olj v vodi. Polisorbati so vrsta emulgatorjev, ki se uporablajo v farmaciji, bioloških raziskavah in prehrambeni industriji. Zaradi stabilnosti in relativne nestrupenosti se kot detergent uporablajo v številnih znanstvenih aplikacijah. Zmanjšuje površinsko napetost rastlin. Ravno ta lastnost je lahko pripomogla k intenzivnejši okužbi sejank s patogeno glivo. Te ugotovitve ne moremo potrditi, saj v našem poskusu nismo posebaj ugotavljal vpliv Tween® 20 na sejanke. To bi lahko naredili, če bi kontrolno skupino poškropili z raztopino vode in Tween® 20.

Do sprememb je prišlo tudi pri razvoju koreninskega sistema. Izmerjene površine koreninskega sistema s programom Win RHIZO tretiranih in netretiranih sejank, so pokazale statistično značilne razlike. Sejanke, ki so bile tretirane z MJ, so razvile manjši koreninski sistem. Njihova skupna površina plašča korenin (SA) je bila manjša. Površina plašča korenin predstavlja absorpcijsko kapaciteto rastline. Ko smo pregledovali slike korenin, ki smo jih skenirali, smo že okularno lahko ocenili razliko v koreninskem sistemu, ki jo imajo tretirane sejanke (PRILOGA B). Vse tretirane sejanke so imele manjšo površino korenin. Večina tretiranih sejank je razvila močnejšo glavno korenino, lahko so se pojavile tudi zelo dolge stranske korenine (zlasti v primeru dodanega P ali vseh treh hranil), ter drobne koreninice. Pri netretiranih sejankah je bil koreninski sistem bujnejši,

razvitih je bilo več drobnih korenin. Pri tretiranih sejankah, ki so vsebovale P in vsa tri hranila skupaj smo opazili podobno. Kaže se tudi zakonitost, da imajo sejanke iz kontrolne skupine manj bujno razvijen koreninski sistem. Slednje velja za tretirane in netretirane sejanke.

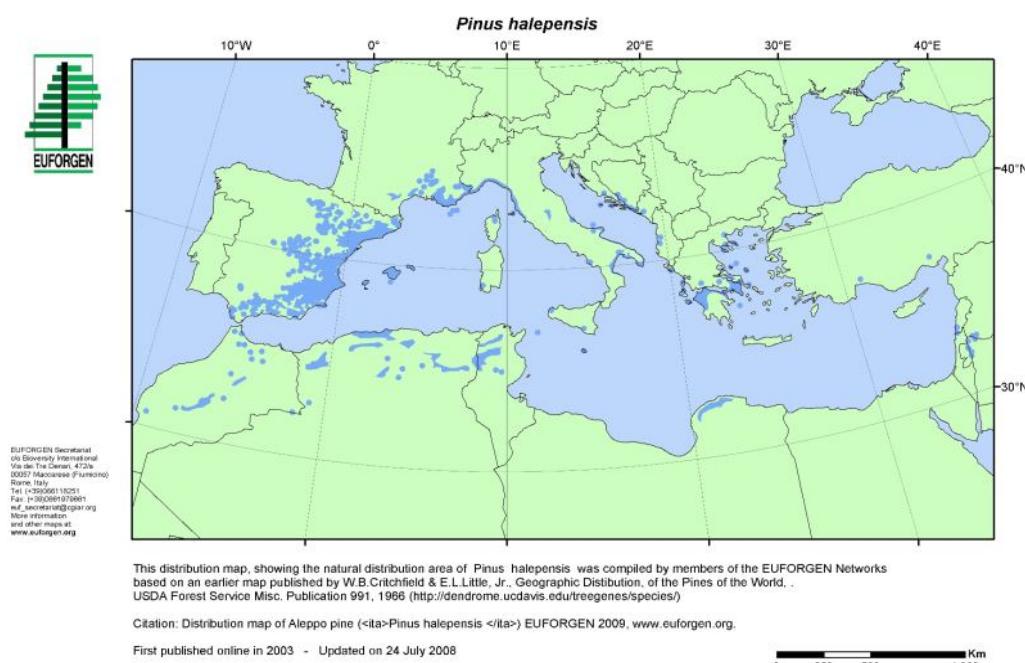
Tretirane sejanke so bile v povprečju manjše. Povprečna končna velikost 5 mesecev starih sejank tretiranih z MJ je znašala 10,43 cm medtem, ko so netretirane dosegle povprečno velikost 11,58 cm. Netretirane sejanke so razvile 1,5 cm daljše zelene dele sejank (6,78 cm vs. 5,31 cm). Razlika je lahko posledica prenehanja rasti vršička tretiranih sejank, in tudi slabše razvijanje drobnih korenin. Lahko bi rekli, da je tertiranje z metil jasmonatom povzročilo poškodbo ali pa omejitev rasti apikalnih meristemskih tkiv.

V številu smolnih kanalov med tertiranimi in netretiranimi sejankami ni bilo razlik, čeprav vemo, da eksogena aplikacija metil jasmonata izzove nastanek travmatskih smolnih kanalov pri vrstah družine Pianaceae, enako kot se to zgodi v primeru ranitve (Franceschi in sod. 2002, Martin in sod. 2002, Hudgins in sod. 2003). Hudgins in sod. (2004) so v študiji o delovanju jasmonske kislino pri različnih vrstah iglavceh dokazali, da sta jasmonska kislina in metil jasmonat osnovna za sprožitev nastanka travmatskih smolnih kanalov in da služita kot signalni molekuli, ki sprožita kompleks obrambnih mehanizmov pri iglavcih. Mi razlik v številu smolnih kanalov nismo zaznali (PRILOGA A).

Nenadno razvijanje novonastalih poganjkov pod mestom okužbe ni bilo značilno za posamezno skupino. Zrastli so na sejankah, ki so bile tretirane z MJ. Lahko da je metil jasmonat vplival na meristeme spečih poganjkov, ki so se nekaj tednov po okužbi začeli naglo razvijati.

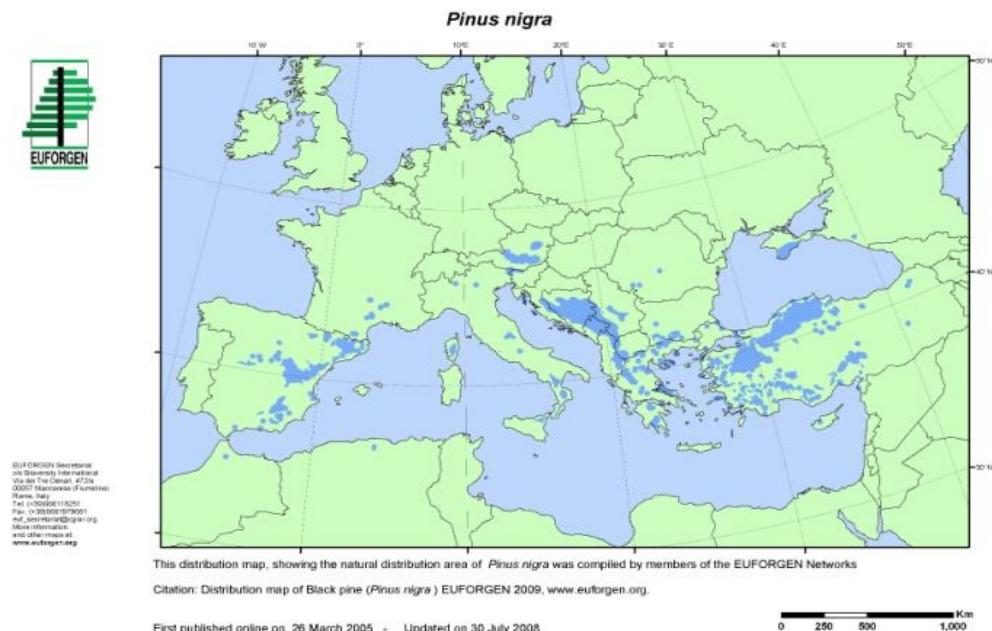
5.2 MOŽNOSTI POJAVA KARANTENSKE GLIVE *Fusarium circinatum* V SLOVENIJI

V Sloveniji bolezen borov smolasti rak še ni navzoča, obstaja pa velika verjetnost, da se bo z nepazljivim in nekontroliranim delom s semenskim in lesnim materialom razširila. Glede na to, da je v sosednji državi Italiji bolezen že prisotna (EPPO 2005), je ta verjetnost še toliko večja. Primerjava rastišč nekaterih vrst borov, ki rastejo ob sredozemski obali, pokaže, da se nekje areali prekrivajo (slika 51). Sredozemske vrste borov naj bi sicer bile bolj odporne (Gordon in sod. 1998), vendar je bolezen že bila opažena v sestojih alpskega bora.

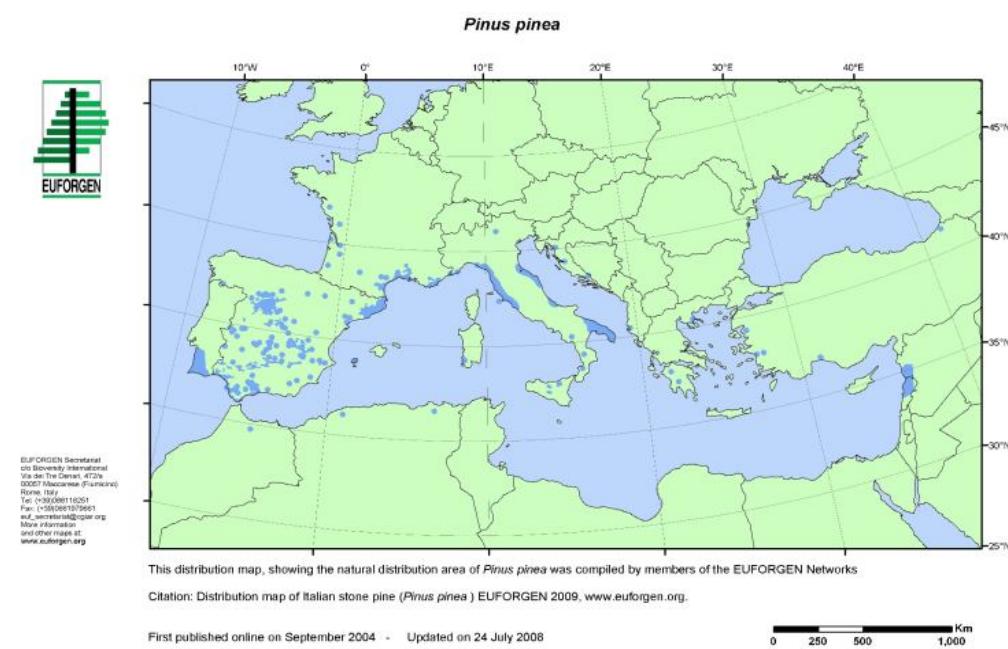


Slika 51: Razširjenost alepskega bora v Evropi (Vir: Distribution maps... 2003)

V slovenskem prostoru lahko bolezen največjo nevarnost predstavljalha črnemu boru, ki raste na Kraškem svetu. Zlasti je lahko nevarena v sestojih, ki se nahajajo blizu kmetijskih površin ali na pogozdenih opuščenih obdelovalnih površinah z veliko vsebnostjo hranilnih snovi, ki so posledica močnega gnojenja v preteklosti .



Slika 52: Razširjenost črnega bora v Evropi (Vir: Distribution maps... 2003)



Slika 53: Razširjenost pinije v Evropi (Vir: Distribution maps... 2003)

6 ZAKLJUČKI

Jasmonska kislina in njen ester metil jasmonat sta signalni molekuli, ki v primeru napada patogenih organizmov v rastlini sprožita obrambni mehanizem. Če poznamo njeni funkciji v rastlini, lahko z eksogeno aplikcijo sintetično pridobljenega metil jasmonata vplivamo oz. sprožimo hitrejši obrambni odziv rastlin na škodljivce. S tem povečamo njihovo odpornost. V našem poskusu rezultati tega niso pokazali, celo nasprotno. Sejanke, ki smo jih tretirali, so bile podvržene hitrejšemu razvoju bolezni zaradi patogene glive *F. circinatum*. Vzrok temu ni napačna predstava o vlogi jasmonske kisline in metil jasmonata, temveč je razlog verjetno drugje. Lahko, da smo na rastline nanesli preveliko koncentracijo jasmonske kisline ($M=25\text{mM}$), ter s tem v rastlini povzročili stres. Nato smo dan po tretiranju z MJ sejanke ranili ter s tem ponovno povzročili stres. S tem smo najverjetnejše zelo zmanjšali odpornost sejank tako, da so ob nanosu patogene glive sejanke hitreje podlegle bolezni. Tega ne bi morali trditi za vse sejanke vrste *P. pinaster*, saj vemo, da je odpornost rastline poleg okoljskega vpliva močno odvisna od genetske zasnove. V našem poskusu smo imeli semena istega matičnega drevesa, torej enake genetske zasnove. Zato menimo, da bi se bilo potrebno poskusa lotiti drugače, z manjšo koncentracijo metil jasmonata in z večjimi časovnimi intervali med posameznimi ukrepi. Za večjo reprezentativnost rezultatov bi morali vzeti številčnejši vzorec ter večjo genetsko raznolikost. Ravno tako bi morali posebaj ugotaviti tudi vpliv emulgatorja Tween® 20 in ranitve na sejanke. To bi lahko naredili tako, da bi vse sejanke v kontrolnem bloku I ranili in pošpricali samo z emulgatorjem.

Ponovno smo potrdili pomembnost vsebnosti hranilnih snovi v substratu za razvoj in odpornost sejank. Prenasičenost rastnega substrata s hranilnim elementom dušikom, vpliva na manjšo odpornost rastline na patogene organizme. Res, da je razvoj rastline hitrejši, vizualni izgled vitalnejši in barva primerna, vendar rastline za optimalno delovanje in obrambo potrebujejo enakomerno rast v substratu s primerno vsebnostjo vseh potrebnih hranilnih elementov. Že v osnovi naj bo lokacija drevesnic in nasadov ter okrasnega drevja z za bolezen dovzetnimi vrstami na primernem območju. Ne smejo se nahajati v bližini kmetijskopredelovalnih obratov in industrijskih odplak. Drevesnice ter okoljsko

preoblikovana območja, kot so npr. golf igrišča, naj se izogibajo prekomernemu gnojenju ter s tem preprečijo pojav bolezni.

Širitev ni odvisna samo od človeškega faktorja, temveč v veliki meri tudi od okoljskih razmer (žuželke, veter). Nad njimi velikokrat nimamo nadzora. Zato je v takih primerih potrebna kurativa, ki je učikovita le, če je opazovanje in spremjava sprememb v sestojih in drevesnicah natančna in ažurna.

7 POVZETEK

Borov smolasti rak je bolezen, ki jo povzroča patogena gliva *Fusarium circinatum*. Napada vse vrste borov, opažen je bil tudi primer okužbe na duglaziji (*Pseudotsuga menziesii*). Bolezen je velika grožnja borovim sestojom. Navzočnost bolezni zmanjšuje kvaliteto dreves v smislu lesnopredelovalne industrije, saj je les okužen s patogeno glivo prepojen s smolo. Oteženo je naravno pomlajevanje sestojev, pojavljam se nepravilnosti v razvoju dreves, odmiranje vej in koreninskega sistema. Značilno je, da gliva lahko napade gostitelja vseh starosti (seme, sejanke, odrasli sestoji). Patogena gliva gostitelja okuži preko ranc. Rane lahko povzročijo žuželke ki se prehranjujejo z lesom, antropogeni dejavniki ter škodljivi okoljski dejavniki. Trosi glice se prenašajo z vetrom, z žuželkami, lahko so prisotni v prsti ali v semenih.

Bolezen se je širila iz Amerike na Japonsko, v Mehiko, v Južnoafriško republiko, v Čile, na Novo Zelandijo,... Leta 2005 je bila uradno zabeležena tudi v evropskem prostoru. Najprej se je pojavila v Španiji, nato v Italiji ter v letu 2008 tudi v Franciji. Bolezen se je po Evropi najverjetneje širila s semenskim materjalom, saj prva poročila o prisotnosti bolezni izvirajo iz drevesnic.

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti ali lahko z eksogeno aplikacijo metil jasmonata vplivamo na delovanje obrambnega mehanizma v rastlinah ter ali ima različna koncentracija NPK gnojil vpliv na odpornost sejank proti patogeni glivi. Zanimalo nas je ali je odpornost tako tretiranih sejank obmorskega bora na patogeno glivo *F. circinatum* večja.

Vzorec namenjen izvedbi poskusa je vseboval 200 sejank vrste *P. pinaster*. Sejanke so bile razdeljene v 9 skupin. Tri mesece smo na 10 dni dodajali različne koncentracije NPK gnojil v obliki vodne raztopine. Nato smo jih sistematično razdelili v štiri bloke. Blok I je služil za kontrolo. Sejanke v bloku II smo tretirali z MJ. V bloku III smo sejanke tretirali z MJ in okužili s patogeno glivo. Sejanke v bloku IV smo samo okužili. S pomočjo razpršilca smo na sejanke nanesli 25 mM koncentracijo metil jasmonata. Dan kasneje smo rastline okužili. Micelij čiste kulture *F. circinatum*, vzgojene v laboratoriju, smo nanesli na rane, ki

smo jih predhodno naredili s skalpelom. Sledilo je osem tedensko opazovanje razvoja simptomov bolezni.

Sejanke v bloku I in II so bile namenjene opazovanju vpliva NPK gnojil ter MJ na rast in razvoj sejank. Ugotovili smo, da je kombinacija kalija in dušika vplivala na rast v višino, dušik ter kombinacija dušika in fosforja na razvoj zelenega dela sejank. Fosfor je vplival na rast koreninskega sistema. Metil jasmonat je v nasprotju s hraničnimi elementi, zaviral rast apikalnih meristemov. Vse sejanke, ki so bile tretirane z MJ so bile manjše, spremenile so bravo (postale so bolj svetlo zelene), iglice na terminalnem poganjku so postale smolnate in zbitne, koreninski sistem je imel manj drobnih korenin.

Sejanke tretirane z MJ (blok III) so bile zaradi okužbe s patogeno glivo bolj prizadete. Odmrlo je več sejank (60 %), tudi razvoj bolezenskih stanj je potekal hitreje. Tu je vzrokov lahko več. Lahko, da so sejanke doživele premočan stres. Časovni interval ukrepov je bil premajhen, saj smo izvedli tretacijo z MJ, ranitev in okužbo v dveh zaporednih dneh. Možno je, da je bila koncentracija MJ premočna (25 mM) in je na sejanke delovala toksično. Tudi vpliv emulgatorja Tween ® 20 ni bil proučevan. V kombinaciji z večjo koncentracijo hraničnih elementov, predvsem dušika, se je smrtnost sejank še povečala.

Sejanke v bloku IV, ki so imele na razpolago največ hraničnih elementov, so najbolj podlegle okužbi s patogeno glivo. V skupini S1, kjer smo sejankam dodajali vse tri hranične elemente, je odmrlo največ sejank. Sledila je skupina S7 (dodan samo dušik), ter S6 (dodan dušik in fosfor). V skupini S4, kjer je bil dodan samo kalij, je bila smrtnost samo 20 %. Enaka smrtnost je bila v skupini S8, kjer ni bilo dodanih NPK hrani.

Pomembno je, da pri vzgoji sejank v drevesnicah ne dodajamo prevelike količine mineralnih gnojil, zlasti dušikovih. Lokacija drevesnic naj bo oddaljena od industrijskih in intenzivnih kmetijskih površin. Semenski material mora biti pred setvijo in prodajo pregledan tako, da se izključi možnost prenosa bolezni. Uporablja naj se semenski material dreves, ki so na patogeno glivo manj dovetni ali celo odporni. Tudi izbira primernih vrst in provenienc za posamezna območja lahko vpliva na zmanjševanje pojavljanja in širjenje bolezni. V drevesnicah je pomembna higiena, tako prsti kot orodja.

8 VIRI

- Balbi V. , Devoto A. 2007. Jasmonate signaling network in *Arabidopsis thaliana*: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. *New phytologist*, 24: 125-131
- Barnard E. L. , Blakslee G. M. 1980. Pitch canker of slash pine seedlings : A new disease in forest tree nurseries. *Plant disease*, 64: 695-696
- Barnard E. L. ,Blakeslee G. M. 2006. Pitch canker of southern pines. *Plant Pathology Circular*, 302: 165-174
- Barnard E. L. 2001. Pitch canker. Florida Department of Agriculture and Consumer Services. USA (31. avg. 2001)
<http://www.invasive.org/images/768x512/4824079.jpg> (15. nov. 2009)
- Barrows-Broaddus J. B. , Dwinell D. 1983. Histopathology of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* in four species of southern pines. *Phytopathology*, 73: 882-889
- Barrows-Broaddus J. , Dwinell L. D. 1985. Branch dieback and cone and seed infection caused by *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* in a loblolly pine seed orchard in South Carolina. *Phytopathology*, 75: 1104-1108
- Barrows-Broaddus J. B. , 1987. Pitch canker. V: Cone and Seed Diseases of North American Conifers. J. R. Sutherland, T. Miller, and R. S. Quinard, (ur.). North American Forestry Commission Publication No. 1. Victoria. B. C. Canada: 42-49
- Blakslee G. M. , Oak S. W. 1979. Significant mortality associated with pitch canker infection of slash pine in Florida. *Plant disease*, 63: 1023-1025
- Bloomberg W. J. 1981. Diseasee casued by *Fusarium* in forest nurseries. V: *Fusarium: diseases, biology and taxonomy*. Nelson P. E. , Tousson T. A. , Cook R. J. (ur.). Harrisburg. The Pennsylvania State University Press: 178-187
- Brinc R. 2003. Jasmonska kislina v rastlinah podvrženim stresu: diplomska naloga. Ljubljana. Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 41 str.
- Brus R. 2004. Drevesne vrste na slovenskem. Ljubljana, Mladinska knjiga: 399 str.
- Bulletin. 2005. Data sheets on quarantine pests: *Gibberella circinata*. OEPP/EPPO 35: 282-286
http://www.eppo.org/QUARANTINE/fungi/Gibberella_circinata/DS_Gibberella_circinata.pdf (12. dec. 2009)

- Carey W. A. , Oak S. W. , Enebak S. A. 2005. Pitch canker rating of longleaf pine clones correlate with *Fusarium circinatum* infestation of seeds and seedling mortality in containers. Forest pathology, 35: 205-212
- Cipollini D. 2006. Consequences of the overproduction of methyl jasmonate on seed production, tolerance to defoliation and competitive effect and response of *Arabidopsis thaliana*. New Phytologist, 173: 146- 153
- Claeson A. , Smith W. H. 1977. Nutrient gradients and pitch canker incidence on skash pine along radii form a poultry farm. Soil and crop science society of Florida proceedings, 37: 142-145
- Correll J. C. , Gordon T. R. , McCain A. H. , Fox J. W. , Koehler C. S. , Wood D. L. , Schultz M. E. 1991. Pitch canker disease in California: pathogenicity, distribution, and canker development on Monterey pine (*Pinus radiata*). Plant Disease, 75: 676–682
- Creelman R. A. , Mullet J. E. 1995. Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. Proceeding of National Academy of Sciences of USA, 92: 4114-4119
- Dioryctria pseudotsugella*. 2010. Pacific Forestry Centre, Victoria, British Columbia, Natural Resources Canada, Canadian Forest Service
http://imfc.cfl.scf.rncan.gc.ca/insm/dioryctria_pseudotsugella_1m.jpg (1. jan. 2010)
- Distribution maps. 2003. EUFORGEN (30. jul. 2008)
http://www.euforgen.org/fileadmin/www.euforgen.org/Documents/Maps/JPG/Pinus_pinaster.jpg (12. 1. 2010)
- Doyle J. J. 1998. Phylogeny of vascular plants. Annual Review of Ecological Systems, 29: 567-599
- Dwinell L. D. , Barrows-Broaddus J. B. , Kuhlman E. G. 1985. Pitch canker - a disease complex of southern pines. Plant disease, 69: 270-276
- Dwinell L. D. , Kuhlman E. G. , Blakeslee G. M. 1981. Pitch canker of southern pines. V: *Fusarium: Diseases, Biology, and Taxonomy*. Nelson P. E. , Toussoun T. A. , Cook R. J. (ur.). Pennsylvania State University Press. University Park. US: 457 str.
- Dwinell D. , Phelps W. R. 1977. Pitch canker of slash pine in Florida. Journal of Forestry, 75: 488–489
- European and mediterranean plant protection organization. 2000. Plant Protection Service. France (17. apr. 2009)
<http://www.eppo.org> (12. dec. 2009)

Extermadura, file from Wikipedia, the free encyclopedia. 2006. Wikimedia fundation (11. feb. 2010)
<http://en.wikipedia.org/wiki/Extremadura> (12. nov. 2009)

Farmer E. E. , Ryan A. C. 1992. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell*, 4: 129-134

FAA Fixation of plant tissue. 2001. Institute of Molecular Development LLC
<http://www.molecularinfo.com/MTM/J/J2/J2-1/J2-1-1/J2-1-1-1.html> (25. nov. 2009)

Fisher R. F. , Garbett W. S. , Underhill E. M. 1981. Effects of fertilization on healthy and pitch canker-infected pines. *Southern journal of applied forestry*, 5: 77-79

Fotso J. , Leslie J. F. , Smith S. 2002. Production of beauvericin, moniliformin, fusaproliferin, and fumonisins B₁, B₂, and B₃ by fifteen ex-type strains of *Fusarium* species. *Applied and environmental microbiology*, 68: 5195-5197

Fraedrich B. R. , Witcher W. 1982. Influence of fertilization on Pitch canker development on three southern pine species. *Plant Disease*, 66, 10: 938-940

Franceschi V. R. , Krekling T. , Berryman A. A. , Cristiansen E. 1998. Specialized phloem parenchyma cells in Norway spruce (Pinaceae) bark are an important site of defense reactions. *American journal of Botany*, 85: 601-615

Franceschi V. R. , Krokene P. , Krekling T. , Cristiansen E. 2000. Phloem parenchyma cells are involved in local and distant defense responses to fungal inoculation or bark-beetle attack in Norway spruce (Pinaceae). *American journal of Botany*, 87: 314-326

Further outbreaks of pitch canker. 2008. FABI
http://www.fabinet.up.ac.za/tpcp/pitch_canker_mature_trees (12. nov. 2009)

Gadgil P. , Dick M. , Simpson J. , Bejakovich D. , Ross M. , Bain J. , Horgan G. , Wylie R. 2003. Management plant response to an incursion of pine canker in Australia and New Zealand. Department of Communications, information and arts. Commonwealth of Australia. Canberra: 99 str.

Gibberella circinata, distribution map of Quarantine pests in Europa. 2006. EPPO (8. jul. 2008)http://www.eppo.org/QUARANTINE/fungi/Gibberella_circinata/GIBBCI_map.htm (12. nov. 2009)

Gordon T. R. , Wikler K. R. , Clark L. , Okamoto D. , Storer A. J. , Bonello P. 1998b. Resistance to pitch canker disease, caused by *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini*, in Monterey pine (*Pinus radiata*). *Plant Pathology*, 47: 706-711

- Gordon T. R. , Storer A. J. , Wood D. L. 2001. The Pitch Canker Epidemic in California. Plant disease, 85: 1128-1139
- Guerra-Santos J. J. 1999. Pitch canker on Monterey pine in Mexico. In: Devey ME, Matheson A. C. , Gordon T. R. Forestry and forest products. Current and potential impacts of pitch canker in radiata pine. (Technical report, vol. 112). Canberra, CSIRO: 58-61
- Herms D. A. , Mattson W. J. 1992. The dilemma of plants: to grow or defend. The Quarterly Review of Biology, 67: 283-335
- Hiel M. , Ton J. 2008. Long-distance signalling in plant defense. Trends in Plant Science, 13, 6: 264- 272
- Hodge G. R. , Dvorak W. S. 2000. Differential responses of Central American and Mexican pine species and *Pinus radiata* to infection by the pitch canker fungus. New Forests, 19: 241–258
- Huber D. M. , Thompson I. A. 2007. Mineral nutrition and plant disease. V: Nitrogen and Plant Disease. Datnoff L. E. , Elmer W. H. , Huber D. M. (ur.). Minnesota. The American Phytopathological Society: 31-44
- Hudgins J. W. , Christiansen E. , Franceschi V. 2003. Methyl jasmonate induces changes mimicking anatomical defenses in diverse members of the Pinaceae. Tree Physiology, 23: 361-371
- Hudgins J. W. , Christiansen E. , Franceschi V. 2004. Induction of anatomically based defenses in steam of diverse conifers by methyl jasmonate: a phylogenetic perspective. Tree Physiology, 24:251-246
- Jasmonic acid. 2009. BMRB (15. jun. 2009)
http://www.bmrb.wisc.edu/metabolomics/mol_summary/?molName=jasmonic_acid
(12. nov. 2009)
- Kelley W. D. , Williams J. C. 1982. Incidence of pitch canker among clones of loblolly pine in seed orchards. Plant Disease, 66: 1171–1173
- Klepzig K. D. , Kruger E. L. , Smalley E. B. , Raffa K. F. 1995. Effects of biotic and abiotic stress on induced accumulation of terpenes and phenolics in red pines inoculated with bark beetle–vectored fungus. Journal of Chemical Ecology, 21: 601-626
- Krekling T. , Franceschi V. R. , Berryman A. A. , Christiansen E. 2000. The struction and development of polyphenolic parenchyma cells in Norway spruce (*Picea abies*) bark. Flora, 195: 354-369

- Krekling T. , Franceschi V. R. , Krokene P. , Solheim H. 2004. Differential anatomical response of Norway spruce stem to sterile and pathogenic fungus-infected inoculations. *Trees*, 18: 1-9
- Kuhlman E. G. , Cade S. 1985. Pitch canker disease of loblolly and ponds pines in North Carolina plantations. *Plant Disease*, 69: 175-176
- Kuhlman E. G. , Dianis S. D, Smith T. K. 1982. Epidemiology of pitch canker disease in a loblolly pine seed orchard in North Carolina. *Phytopathology*, 72: 1212-1216
- Kotar M. 2005. Hranilni elementi in njihov fiziološki pomen pri rastlinah. V: Zgradba, rast in donos gozda na ekoloških in fizioloških osnovah. Ljubljana, Zveza gozdarskih društev Slovenije, Zavod za gozdove Slovenije: 94-95
- Landeras E. , Garcia P. , Fernandez Y. , Braña M. , Fernandez-Alonso O. , Mendez-Lodos S. , Perez-Sierra A. , Leon M. , Abad-Compos P. , Berbegal M. , Beltran R. , Garcia-Jimenez J. , Armengol J. 2005. Outbreak of pitch canker caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus* spp. in Northeren Spain. *Plant disease*, 89: 1015
- Leslie J. F. , Summerell B. A. 2006. Pitch canker disease of pine *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell Anamorphic fungi. PaDIL. (21. dec. 2007)
<http://www.padil.gov.au/viewPest.aspx?id=582> (21. dec. 2009)
- Lewinsohn E. , Gijzen M. , Croteau R. 1991. Defense mechanisems of conifers. Differences in constitutive and wound-induced monoterpenes biosynthesis among species. *Plant physiology*, 96: 44-49
- Lieutier F. , Berryman A. A. 1988. Preliminary histological investigations of defense reactions of three pines to *Ceratocystis clavigera* and two chemical elicitors. *Canadian Journal of Forest Research*, 18 :1243-1247
- Lopez-Zamora I. , Bliss C. , Jokela E. J. , Comerford N. B. , Grunwald S. , Barnard E. ,Vasquez G. M. 2007. Spetial relationships between nitrogen status and pitch canker disease in slash pine planted adjacent to a poultry operation. *Environmental Pollution*, 147: 101-111
- Mattson W. J. 1980. Herbivory in relation to plant nitrogen content. *Annual review of ecology and systematics*, 11: 119-161
- McCain J. F. , Koehler C. S. , Tjosvold S. A. 1987. Pitch canker threatens Californian pines. *California agriculture*, 41: 22-23
- Miller T. , Bramlett D. L. 1979. Damage to reproductive structures of slash pine by two seedborne pathogens: *Diplodia gossypina* and *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. V: Proceedings: symposium on flowering and seed development in trees. Bonner F. (ur.). Mississippi state university: 337-355

- Mongragüe, file from Wikipedia, the free encyclopedia. 2004. Wikimedia foundation (12. dec. 2009)
<http://en.wikipedia.org/wiki/Monfragüe> (12. nov. 2009)
- Moreira X. , Sampedro L. , Zas R. , Solla A. 2008. Alterations of the resin canal system of *Pinus pinaster* seedlings after fertilization of a healthy and of a *Hylobius abietis* attacked stand. Trees, 22: 771-777
- Munda A. 2008. Program posebnega nadzora za glivo *Gibberella circinata* Nirenberg & O'Donnell (anamorf *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell) za leto 2008. Ljubljana, Fitosanitarna uprava RS: 6 str.
http://www.furs.si/svn/zvr/POSNadzori/Gibberella/Program%20PN%20Gcircinata%202008_pred_sprejemom.pdf (17. feb. 2010)
- Muñoz C. , Ampudia M. 2005. Ensayos de patogeneidad de *Fusarium circinatum* Nirenberg y O'Donnell en plantas de *Pinus radiata* D. Don. V: Actas 4º Congreso Forestal Español. Zaragoza, Sociedad Española de Ciencias Forestales: 369
- Muramoto M. , Dwinell L. D. 1990. Pitch canker of *Pinus luchuensis* in Japan. Plant disease, 74: 530
- Murray T. 2007. Weevil - *Pissodes nemorensis*. Bugguide. (26. avg. 2007)
<http://bugguide.net/node/view/112662/bgimage> (27. dec. 2009)
- Nirenberg H. I. , O'Donnell K. 1998. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycologia, 90: 434–458
- Nohrstedt H. Ö. 2001. Response of coniferous forest ecosystems on mineral soils to nutrient additions: A review of Swedish experiences. Scandinavian Journal of Forest Research, 16, 6: 555-573
- O4 Fusa circi PDA. 2007. DRAAF LORRAINE (5. mar. 2010)
<http://draf.lorraine.agriculture.gouv.fr/phpwebgallery/category.php?cat=55> (18. nov. 2009)
- Ormsby M. 2004. Report on the interception of *Fusarium circinatum* (Pitch Canker) on imported seedlings of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*).
http://www.fas.usda.gov/ffpd/wto_sps_tbt_notifications/forest_products/NNZL280_Report.pdf (4. mar. 2010)
- Perez-Sierra A. , Landeras E. , Leon M. , 2007. Characterization of *Fusarium circinatum* from *Pinus* spp. In northern Spain. Mycological research, 111: 832-839

Petrovič N. , Miersch O. , Ravnikar M. , Kovač M. 1997. Potato virus Y^{NTN} alters the distribution and concentration of endogenous jasmonic acid in potato plants grown *in vitro*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 50: 273-244

Pinus pinaster Aiton 1789. 2007. The gymnosperm database (15. jul. 2009)

<http://www.conifers.org/pi/pin/pinaster.htm> (5. jan. 2010)

Peña-Cortés H. , Barrios P. , Dorta F. , Polanco V. , Sánchez E. , Remírez I. 2005. Involvement of jasmonic acid and derivates in plant responses to pathogens and insects and in fruit ripening. *Journal of Plant Growth Regulation*, 23: 246-269

Presence of the quarantine fungus *Fusarium circinatum* on pines in Galicia. 2006. Estación de Fitopatoloxía do Areeiro
<http://www.efa-dip.org/EN/Secciones/PReferencias/FCIRCINATUM%20.htm> (21. dec. 2009)

Ravnikar M. 1991. Fiziološka in anatomsko-morfološka študija vpliva jasmonske kisline na rast in razvoj rastlin v tkivni kulturi: doktorska disertacija (Oddelek za biologijo). Ljubljana, samozal: 101 str.

Rosner S. , Hannrup B. 2004. Resine canal traits relevant for constitutive resistance of Norway spruce against bark beetles: environmental and genetic variability. *Forest ecology and management*, 200: 77-78

Sairanen A. 1990. Site characteristics of Scots pine stands infected by *Gremmeniella abietina* in central Finland. I: Mineral soil sites. *Acta forestalia Fennica*, 216: 1-27

Sinclair W. A. , Lyon H. H. 2005. Diseases of trees and shrubs. 2nd ed. Ithaca NY, Cornell University press: 660 str.

Schmidt R. A. , Wilkinson R. C. , Moses C. S. , Broerman F. S. 1976. Drought and weevils associated with severe incidence of pitch canker in Volusia Country, Florida. Institute of food and agricultural sciences. University of Florida progress report, 76: 2-4

Snoeijers S. , Pérez Gracia A. , Joosten M. , De Wit P. 2000. The effect of nitrogen on disease development and gene expression in bacterial and fungal plant pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 106: 493-506

Stenzel I. , Hause B. , Proels R. , Miersch O. , Oka M. , Roitsch T. , Wasternack C. 2008. The AOC promoter of tomato is regulated by developmental and environmental stimuli. *Phytochemistry*, 69, 9: 1859-1865

Storer A. J. , Gordon T. R. , Dallara P. L. , Wood D. L. 1994. Pitch canker kills pines, spreads to new species and regions. *California Agriculture*, 48, 6: 9-13

- Storer A. J. , Gordon T. R. , Wood D. L. , Bonello P. 1997. Pitch canker disease of pines: current and future impacts. *Journal of Forestry*, 95: 21–26
- Storer A. J. , Bonello P. , Gordon T. R. , Wood D. L. 1999. Evidence of resistance to the pitch canker pathogen (*Fusarium circinatum*) in native stands of Monterey pine (*Pinus radiata*). *Forest Science*, 45: 500–505
- Storer A. J. , Wood D. L. , Gordon T. R. 2002. The epidemiology of pitch canker of Monterey pine in California. *Forest Science*, 48: 694–700
- Templeton S. R. , Wood D. L. , Storer A. J. ,Gordon T. R. 1997. Economic damages of pitch canker. *Fremontia*, 25: 10–14
- Tomšič E. 2008. Jasmonska in salicilna kislina v krompirju odpornim na okužbo s kropmirjevim virusom PVY^{NTN}: diplomsko delo. (Biotehniška fakulteta, Medoddelčni študij mikrobiologije). Ljubljana, samozal. : 78 str.
- Trapp S. , Croteau R. 2001. Defensive resin biosynthesis in conifers. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 52: 689-724
- Urbanek Krajnc A. 2009. A temporal analysis of antioxidative defense responses in the phloem of *Picea abies* after attack by *Ips typographus*. *Tree physiology*, 29, 8:1059-1068
- Vanakker L. , Alfaro R. , Brockley R. 2004. Effects of fertilization on resin canal defences and incidence of *Pissodes strobi* attack in interior spruce. *Canadian Journal of Forest Research*, 34: 855-862
- Vivas M. , Vrhovnik M. , Solla A. 2009. Fertilización de plántulas de *Pinus pinaster* y su efecto en la susceptibilidad a *Fusarium circinatum*. V: 5 ° Congreso Forestal Español, Avila, 21-25 sep. 2009: 1-8
- Viljoen A. , Wingfield M. J. , Marasas W. F. O. 1994. First report of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* on pine seedlings in South Africa. *Plant disease*, 78: 309-312
- Wainhouse D. , Rose D. R. , Pearce J. 1997. The influence of preformed defences on the dynamic wound response in spruce bark. *Functional Ecology*, 11: 564-572
- Wasternack C. , Parthier B. 1997. Jasmonate signalled plant gene expression. *Trends in Plant science*, 2, 8: 302-307
- Wingfield M. J. , Jacobs A. , Coutinho T. A. , Ahumada R, Wingfield B. D. 2002. First report of the pitch canker fungus, *Fusarium circinatum*, on pines in Chile. *Plant pathology*, 51: 397

Wingfield M. J. , Slippers B. , Roux J. , Wingfield B. D. 2001. Worldwide movement of exotic forest fungi, especially in the tropics and the southern hemisphere. BioScience, 51: 134-140

Winney N. 2010. *Rhyacionia pinicolana*. UKmoths
<http://ukmoths.org.uk/show.php?bf=1211> (27. dec. 2009)

ZAHVALA

Za nastanek moje diplomske naloge se moram v prvi vrsti zahvaliti prof. dr. Maji Jurc, ki mi je omogočila sodelovanje z dr. Alejandrom Solla Hachom, na Univerzi v Extermaduri v Španiji. Nato bi se zahvalila somentorju dr. Alejandru Solla Hachu, ki me je s svojim strokovnim, zanimivim in hkrati zabavnim pristopom vodil skozi eksperimentalni del diplomske naloge. Zahvalila bi se tudi vsem profesorjem in študentom na Oddeleku za gozdarski inženiring v Plasenciji (Ingeniería Técnica Forestal especialidad en Explotaciones Forestales, Plasencia), ki so mi pomagali pri delu, mi dajali spodbudo in občutek domačnosti ter poskrbeli, da teh treh mesecev, preživetih v Plasenciji, nikoli ne bom pozabila.

Zahvale za dokončanje naloge gredo mentorju dr. Dušanu Jurcu in recenzentki dr. Maji Ravnikar, ki sta opravljeno delo in napisano nalogu kritično pregledala ter pomagala, da je nastalo delo dobro. Posebaj se zahvaljujem Špeli in Tini za potrpežljivo popravljanje mojih napak.

Zahvaljujem se svoji mami Veri, očetu Francu in sestri Katji ter Davorju, ki verjamejo vame, tudi takrat, ko sama ne.

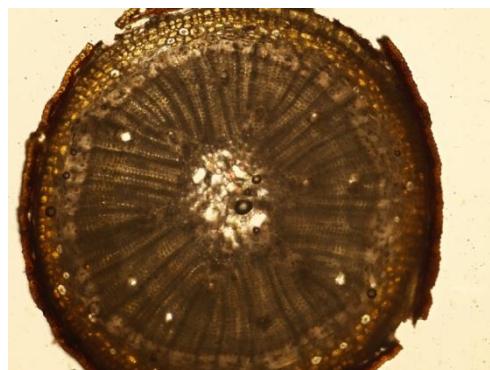
Zahvaljujem se vsem sošolcem in prijateljem, s katerimi smo preživeli nepozabne študentske dni in poskrbeli za to, da so bili tudi deževni dnevi sončni.

Hvala vsem

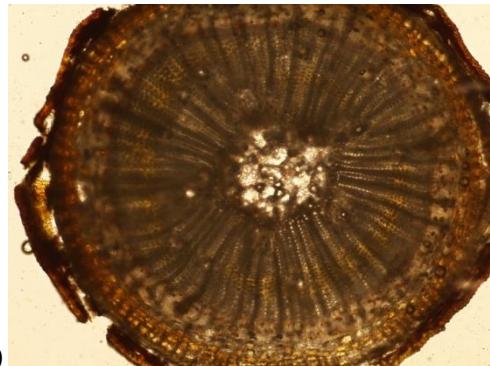
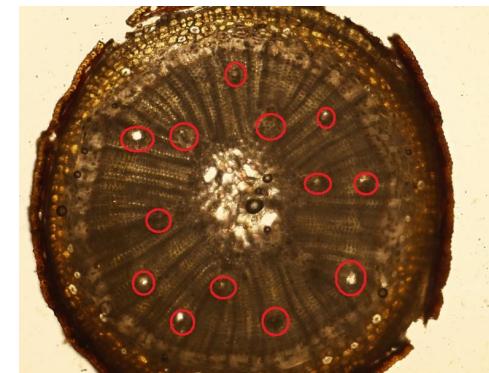
PRILOGE

Priloga A

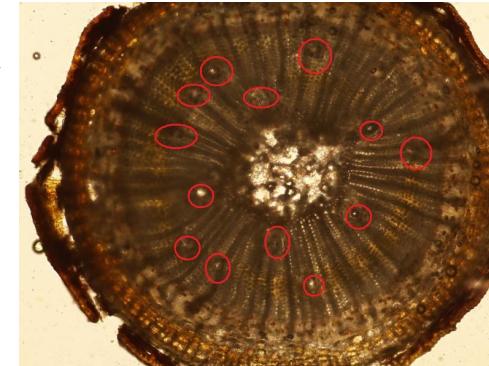
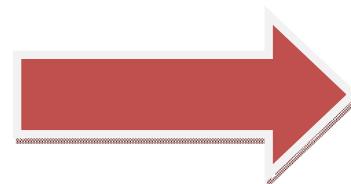
Primer naključno izbranih rezov stebelnega tkiva in okularna ocena števila smolnih kanalov



MJ=1



MJ=0

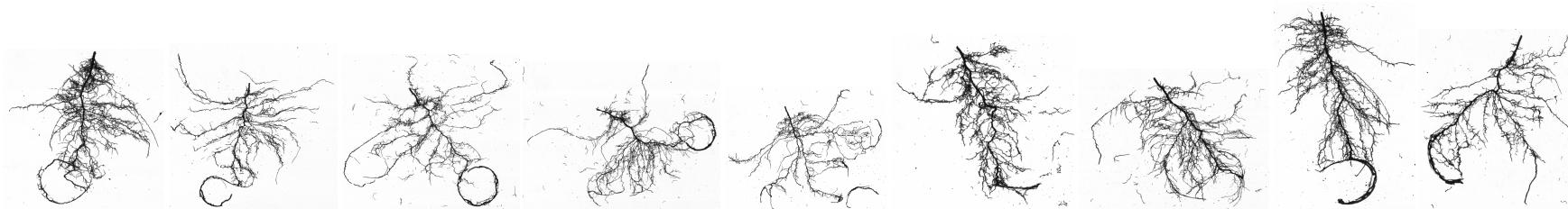


Priloga B

Primerjava koreninskega sistema tretiranih in netretiranih sejank (primer naključno izbranih sejank iz vsake skupine)

S2 +N-P+K	S1 +N+P+K	S3 -N+P+K	S4 -N-P+K	S5 -N+P-K	S6 +N+P-K	S7 +N-P-K	S8 -N-P-K	K
--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	---

MJ=0



MJ=1



