

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Tine HAUPTMAN

**ZNAČILNOSTI GLIVE *Chalara fraxinea* IN
MOŽNOSTI ZATIRANJA JESENOVEGA OŽIGA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Tine HAUPTMAN

**ZNAČILNOSTI GLIVE *Chalara fraxinea* IN MOŽNOSTI ZATIRANJA
JESENovega OŽIGA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**CHARACTERISTICS OF THE FUNGUS *Chalara fraxinea* AND
POSSIBILITIES FOR THE CONTROL OF ASH DIEBACK**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2014

Doktorska disertacija je zaključek podiplomskega doktorskega študijskega programa bioloških in biotehniških znanosti na znanstvenem področju gozdarstva in obnovljivih gozdnih virov. Laboratorijsko delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za varstvo gozdov, v Oddelku za varstvo gozdov Gozdarskega inštituta Slovenije, Večna pot 2, Ljubljana.

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepu 20. seje Komisije za doktorski študij UL z dne 21. 9. 2011 sta bila z odločbo št. 5-1695/11 VJJ sprejeta tema in naslov disertacije, za mentorja pa je bil imenovan prof. dr. Dušan Jurc.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Franc BATIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Dušan JURC
Gozdarski inštitut Slovenije, Oddelek za varstvo gozdov

Član: prof. dr. Danko DIMINIĆ
Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, Zavod za zaštitu šuma i lovno gospodarenje

Datum zagovora: 19. 2. 2014

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem besedilu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani različici.

Tine HAUPTMAN

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	GDK443Chalara fraxinea:416.11(043.3)=163.6
KG	<i>Chalara fraxinea/Hymenoscyphus pseudoalbidus/jesenov ožig/Fraxinus spp./temperatura/fungicidi/urea/zatiranje/individualna odpornost/Slovenija</i>
AV	HAUPTMAN, Tine, univ. dipl. inž. gozdarstva
SA	JURC, Dušan (mentor)
KZ	SI-1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta
LI	2014
IN	ZNAČILNOSTI GLIVE <i>Chalara fraxinea</i> IN MOŽNOSTI ZATIRANJA JESENovega OŽIGA
TD	Doktorska disertacija
OP	XIV, 121 str., 12 preg., 56 sl., 1 pril., 157 vir.
IJ	sl
JI	sl/en

AI V devetih jesenovih semenskih sestojih in klonski plantaži poljskega jesena je bila ocenjena poškodovanost jesenov zaradi glive *Chalara fraxinea*, raziskovan pa je bil tudi vpliv drugih škodljivih organizmov in dejavnikov na proces propadanja jesenov. V klonski plantaži se je proučevala tudi domnevna individualna odpornost posameznih jesenov ter obrambni mehanizmi (zgodnje odganjanje listja, zgodnje odpadanje listja ter zaviranje rasti patogena v gostiteljskih tkivih), ki bi lahko bili vzrok odpornosti na jesenov ožig. Z laboratorijskimi testi se je proučeval vpliv temperature na glivo *C. fraxinea*, preverjala se je možnost topotnega zatiranja patogena, testirala so se različna sredstva za kemično zatiranje glive, med drugimi glivami, ki naseljujejo jesenova tkiva, pa se je iskalo njenega antagonista. Povprečni delež odmrle krošnje v semenskih sestojih je variiral med 7,2 in 38,7 %, mortaliteta je bila v povprečju 1,9 %. V klonski plantaži poljskega jesena so bile odkrite velike razlike v poškodovanosti posameznih klonov. Leta 2012 je npr. delež poškodovane krošnje variiral med 14,2 in 83,3 %. Omenjeni obrambni mehanizmi niso bili potrjeni kot vzrok odpornosti. Ugotovljeno je bilo, da v procesu propadanja jesenov pomembno sodelujejo mraznice, in sicer *Armillaria gallica*, *A. cepistipes* in *A. mellea*, in da jesene vse bolj ogrožajo tudi jesenovi podlubniki. Laboratorijski testi so pokazali, da so optimalne temperature za rast glive med 20 in 22 °C, temperature nad 28 °C pa so za uspevanje glive previsoke. Poskusa topotnega obdelave sadik in okuženih poganjkov velikega jesena v vodi sta pokazala, da je možno s primernimi načini obdelave (npr. 10 ur pri 36–40 °C) uničiti glivo v okuženih tkivih, pri tem pa se preživetja sadik ne ogrozi. Z merjenji temperatur in na sadikah velikega jesena v naravi je bilo ugotovljeno, da vroča poletna obdobja lahko ovirajo razvoj jesenovega ožiga. Rast glive *C. fraxinea* in oblikovanje apotecijev teleomorfa *Hymenoscyphus pseudoalbidus* sta izmed osmih testiranih fungicidov najbolje zavirali sredstvi z aktivnima snovema karbendazim in prokloraz. Rast apotecijev je zelo učinkovito preprečila tudi 24-urna obdelava okuženih jesenovih pecljev v 0,25 % raztopini uree. 13 od 19 testiranih gliv je v dvojnih kulturah preraščalo kolonije glive *C. fraxinea*, dve pa sta s kolonijami glive *C. fraxinea* oblikovale inhibicijske cone. Predvideva se, da je med temi glivami za biološko zatiranje jesenovega ožiga najbolj primerna gliva *Hypocrea* sp.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dd
DC	FDC443Chalara fraxinea:416.11(043.3)=163.3
CX	<i>Chalara fraxinea/Hymenoscyphus pseudoalbidus</i> /ash dieback/ <i>Fraxinus</i> spp./temperature/fungicides/urea/control/individual resistance/Slovenia
AU	HAUPTMAN, Tine, BSc forestry
AA	JURC, Dušan (supervisor)
PP	SI-1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty
PY	2014
TI	CHARACTERISTICS OF THE FUNGUS <i>Chalara fraxinea</i> AND POSSIBILITIES FOR THE CONTROL OF ASH DIEBACK
DT	Doctoral Dissertation
NO	XIV, 121 str., 12 tab., 56 fig., 1 ann., 157 ref.
LA	sl
AL	sl/en

AB Damage of ash trees caused by *Chalara fraxinea* was observed in nine ash seed collecting stands and in clonal plantation of narrow-leaved ash. Other harmful organisms and factors that influence the ash decline process were also looked for. In clonal plantation, individual resistance of ashes and defence mechanisms, such as early flushing in spring, early leaf shedding and ability to inhibit growth of pathogen in host tissue were also investigated. In laboratory experiments the temperature effect on *C. fraxinea* was studied, possibilities for thermal control of the pathogen were examined and different products for chemical control of the fungus were tested. Furthermore, within the group of other fungi, which were isolated from diseased ash tissue, antagonist of the pathogen was sought. Mean dead crown share in ash seed collecting stands varied between 7.2 and 38.7%, mean mortality was 1.9%. Big differences in damage between clones were observed in clonal plantation. For example, mean damaged crown share in 2012 varied between 14.2 and 83.3%. Assumed defence mechanisms were not confirmed as a cause of resistance. Fungi from genus *Armillaria*, namely *A. gallica*, *A. cepistipes* and *A. mellea* proved to be importantly involved in ash decline process. It was discovered that ash bark beetles also represent a growing threat to ashes. Laboratory experiments showed temperature interval of 20–22 °C to be optimal for pathogens growth, while temperatures above 28 °C seem to be too high for the development of the fungus. Hot water treatments of sapling and diseased shoots of common ash demonstrated that proper heat treatment (10 hours at 36–40 °C, for example) can destroy pathogen inside the host tissue without compromising the survival of saplings. Measurements of temperature in and on common ash saplings in nature demonstrated that hot summer weather periods can inhibit ash dieback development. Among eight tested fungicides, growth of *C. fraxinea* as well as development of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* apothecia was most efficiently inhibited by the products with active ingredients carbendazim and prochloraz. Development of apothecia was successfully prevented also by the 24-hour treatment of diseased leaf petioles in 0.25% urea solution. *C. fraxinea* colonies in dual cultures were overgrown by 13 out of 19 tested fungi, while two additional fungi formed with *C. fraxinea* colonies inhibition zones. Among them, *Hypocrea* sp. seems to be the most suitable for the biological control of ash dieback.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	XIII
OKRAJŠAVE	XIV
1 UVOD.....	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 RAZŠIRJENOST BOLEZNI IN POŠKODOVANOST JESENOMIH SESTOJEV V EVROPI.....	3
2.2 GLIVA, POVZROČITELJICA JESENOVEGA OŽIGA	6
2.2.1 Iskanje povzročitelja in odkritje nove vrste.....	6
2.2.2 Odkritje teleomorfa	7
2.2.3 Iskanje izvora glive <i>H. pseudoalbidus</i>	9
2.3 RAZVOJNI KROG IN SIMPTOMI BOLEZNI.....	10
2.4 MOŽNOSTI ZATIRANJA GLIVE.....	14
2.5 INDIVIDUALNA ODPORNOST POSAMEZNIH JESENOM.....	16
2.6 OBJAVE RAZISKAV TE DOKTORSKE DISERTACIJE	17
3 MATERIAL IN METODE	18
3.1 VPLIV TEMPERATURE NA GLIVO <i>Chalara fraxinea</i>	18
3.1.1 Vpliv temperature na rast glive <i>Chalara fraxinea</i> v čisti kulturi.....	18
3.1.2 Toplotna obdelava kultur glive <i>Chalara fraxinea</i>	19
3.1.3 Toplotna obdelava sadik in okuženih poganjkov velikega jesena (<i>F. excelsior</i>) v vodi	19
3.1.3.1 Segrevanje okuženih sadik velikega jesena	19
3.1.3.2 Segrevanje vizualno zdravih jesenovih sadik in okuženih poganjkov velikega jesena	20
3.1.3.3 Izolacije gliv v čiste kulture in morfološka karakterizacija izolatov	21
3.1.3.4 Molekularna determinacija izoliranih morfotipov	21
3.1.4 Spremljanje temperatur na sadikah velikega jesena (<i>F. excelsior</i>).....	22
3.1.5 Analize podatkov raziskav vpliva temperature na glivo <i>C. fraxinea</i>	23

3.2	VPLIV IZBRANIH FUNGICIDOV IN UREE NA GLIVO <i>Chalara fraxinea</i>	24
3.2.1	Vpliv izbranih fungicidov in uree na rast glive v čisti kulturi.....	24
3.2.2	Vpliv izbranih fungicidov in uree na oblikovanje apotecijev glive <i>H. pseudoalbidus</i>	25
3.2.3	Analiza podatkov raziskav vpliva fungicidov in uree na glivo <i>C. fraxinea</i>.....	26
3.3	INTERAKCIJE MED GLIVO <i>C. fraxinea</i> IN DRUGIMI GLIVAMI, KI SMO JIH IZOLIRALI IZ JESENOVIH TKIV	27
3.4	INDIVIDUALNA ODPORNOST POLJSKEGA JESENA (<i>Fraxinus angustifolia</i>)	28
3.4.1	Klonski nasad poljskega jesena v Hraščici	28
3.4.2	Popisi poškodovanosti krošenj.....	28
3.4.3	Inokulacije glive <i>C. fraxinea</i> v veje izbranih klonov.....	28
3.4.4	Popisi odpadlega listja ter razvitosti brstov	29
3.4.5	Pregled koreničnikov izbranih klonov	30
3.4.6	Izolacije gliv iz odvzetih vzorcev okuženih koreničnikov in molekularna determinacija gliv iz rodu <i>Armillaria</i>.....	30
3.4.7	Analize rezultatov	31
3.5	POŠKODOVANOST JESENOV V JESENOVIH SEMENSKIH OBJEKTIH	31
3.5.1	Izbor lokacij in postavitev raziskovalnih ploskev	31
3.5.2	Izbor in popis jesenovih dreves na raziskovalnih ploskvah	33
3.5.3	Analiza rezultatov	33
4	REZULTATI.....	34
4.1	VPLIV TEMPERATURE NA GLIVO <i>Chalara fraxinea</i>	34
4.1.1	Vpliv temperature na rast glive <i>Chalara fraxinea</i> v čisti kulturi.....	34
4.1.2	Toplotna obdelava kultur glive <i>Chalara fraxinea</i>	37
4.1.3	Toplotna obdelava sadik in okuženih poganjkov velikega jesena (<i>F. excelsior</i>) v vodi	38
4.1.3.1	Segrevanje okuženih sadik velikega jesena	38
4.1.3.2	Segrevanje vizualno zdravih jesenovih sadik in okuženih poganjkov velikega jesena	40
4.1.4	Spremljanje temperature na sadikah velikega jesena (<i>F. excelsior</i>)	41
4.2	VPLIV IZBRANIH FUNGICIDOV IN UREE NA GLIVO <i>Chalara fraxinea</i>	43
4.2.1	Preliminarni test vpliva fungicidov na rast glive <i>C. fraxinea</i> v čisti kulturi.....	43
4.2.2	Podrobni test vpliva petih izbranih fungicidov na rast glive <i>C. fraxinea</i> v čisti kulturi	43
4.2.3	Vpliv uree na rast glive <i>C. fraxinea</i> v čisti kulturi	47
4.2.4	Vpliv izbranih fungicidov na oblikovanje apotecijev glive <i>H. pseudoalbidus</i>	50
4.2.5	Vpliv uree na oblikovanje apotecijev glive <i>H. pseudoalbidus</i>.....	55

4.3	INTERAKCIJE MED GLIVO <i>C. fraxinea</i> IN DRUGIMI GLIVAMI, KI SMO JIH IZOLIRALI IZ JESENOMIHKIHL TKIV	57
4.4	INDIVIDUALNA ODPORNOST POLJSKEGA JESENA (<i>Fraxinus angustifolia</i>)	61
4.3.1	Popisi poškodovanosti krošenj.....	61
4.3.2	Inokulacije glive <i>C. fraxinea</i> v veje izbranih klonov.....	64
4.3.3	Popis deleža odpadlega listja ter stopnje spomladanske razvitosti brstov	65
4.3.4	Pregled koreničnikov izbranih klonov	69
4.5	POŠKODOVANOST JESENOM V JESENOMIHKIHL SEMENSKIHL OBJEKTHIHL	73
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	76
5.1	RAZPRAVA	76
5.1.1	Vpliv temperature na glivo <i>Chalara fraxinea</i>	76
5.1.2	Vpliv izbranih fungicidov in uree na glivo <i>Chalara fraxinea</i>	79
5.1.3	Interakcije med glivo <i>C. fraxinea</i> in drugimi glivami, ki smo jih izolirali iz jesenomih tkiv.....	84
5.1.4	Individualna odpornost poljskega jesena (<i>F. angustifolia</i>)	88
5.1.5	Poškodovanost jesenom v jesenomih semenskihl objekthihl	93
5.2	SKLEPI.....	97
5.2.1	Odgovori na zastavljene raziskovalne hipoteze	97
5.2.2	Gospodarjenje z jesenom v prihodnje	100
6	POVZETEK (SUMMARY)	102
6.1	POVZETEK	102
6.2	SUMMARY	106
7	VIRI	110

ZAVALA
PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Podatki izbranih izolatov glive <i>C. fraxinea</i>	18
Preglednica 2: Podatki o fungicidih, ki smo jih uporabili v preliminarnem testu	24
Preglednica 3: Glive, ki smo jih v dvojnih kulturah gojili skupaj z glivo <i>C. fraxinea</i>	27
Preglednica 4: Podatki o izbranih jesenovih semenskih objektih in datumi popisov.....	32
Preglednica 5: Hitrost radialne rasti kolonij (mm/dan) glive <i>Chalara fraxinea</i> pri različnih temperaturah	36
Preglednica 6: Uspešnost izolacije (%) glive <i>C. fraxinea</i> in drugih gliv iz okuženih tkiv velikega jesena po topotnih obdelavah v vodi aprila 2010, novembra 2010 in marca 2011	39
Preglednica 7: Premer (povprečje ± st. napaka) kolonij glive <i>C. fraxinea</i> na gojiščih s tremi različnimi koncentracijami petih različnih aktivnih snovi. Prikazane so relativne vrednosti glede na rast glive na kontrolnih gojiščih	44
Preglednica 8: Premer (povprečje ± st. napaka) kolonij glive <i>C. fraxinea</i> na gojiščih z različno vsebnostjo uree. Prikazane so relativne vrednosti glede na rast glive na kontrolnih gojiščih.....	48
Preglednica 9: Število apotecijev (N/cm), ki so se oblikovali na jesenovih pecljih po 24-urnih obdelavah z različnimi koncentracijami petih različnih aktivnih snovi. Prikazana so povprečja in standardne napake	50
Preglednica 10: Povprečna površina trosovnic apotecijev (mm ² /cm), ki so se oblikovali na jesenovih pecljih po 24-urnih obdelavah z različnimi koncentracijami petih različnih aktivnih snovi. Prikazana so povprečja in standardne napake	51
Preglednica 11: Delež poškodovane krošnje 20 različnih klonov vrste <i>Fraxinus angustifolia</i> v letih 2009, 2010, 2011 in 2012 ter razlika v deležu poškodovane krošnje posameznih klonov med prvim in zadnjim popisom poškodovanosti. Prikazana so povprečja in standardne napake	62
Preglednica 12: Delež znamenj poškodovanosti, mraznice in odmrlih dreves na poskusnih ploskvah	73

KAZALO SLIK

Slika 1: Razširjenost velikega jesena (<i>Fraxinus excelsior</i>) v Evropi in leta najdb prvih simptomov jesenovega ožiga v posameznih državah (Bengtsson, 2013; Ash species..., 2005)	4
Slika 2: Skupni in sanitarni posek velikega in poljskega jesena v Sloveniji (Timber, 2000–2012) ..	5
Slika 3: Fialide in konidiji glive <i>Chalara fraxinea</i>	7
Slika 4: Apotecija glive <i>H. pseudoalbidus</i> na odpadlem listnem peclju velikega jesena (<i>F. excelsior</i>).....	8
Slika 5: Ask (levo) in askospore (desno) glive <i>H. pseudoalbidus</i>	9
Slika 6: Nekroza listnega peclja velikega jesena, ki jo je povzročila gliva <i>C. fraxinea</i> (foto: N. Ogris)	11
Slika 7: Gliva <i>C. fraxinea</i> je povzročila nekroze skorje (levo) in obarvanost lesa (desno). Na sliki (levo) je vidna tudi listna brazgotina, kjer je gliva domnevno iz okuženega lista prišla v debelce	12
Slika 8: Odmiranje krošnje velikega jesena zaradi okužbe z glivo <i>C. fraxinea</i>	13
Slika 9: Kad, v kateri smo v vodi toplotno obdelali sadike in poganjke velikega jesena.....	20
Slika 10: Sadika velikega jesena, opremljena s temperaturnimi senzorji	23
Slika 11: Lokacije izbranih semenskih objektov.....	32
Slika 12: Hitrost radialne rasti kolonij štirih različnih izolatov glive <i>C. fraxinea</i> pri različnih temperaturah na gojiščih MEA in PDA. Prikazana so povprečja in standardne napake ..	35
Slika 13: Kultivabilnost glive <i>C. fraxinea</i> po različnih toplotnih obdelavah	37
Slika 14: Delež preživelih sadik in uspešnost izolacij glive <i>C. fraxinea</i> in drugih gliv iz okuženih jesenovih sadik po toplotnih obdelavah v vodi aprila 2010.....	38
Slika 15: Delež preživelih sadik ter uspešnost izolacije glive <i>C. fraxinea</i> in drugih gliv iz okuženih jesenovih poganjkov po toplotnih obdelavah v vodi novembra 2010	40
Slika 16: Delež preživelih sadik ter uspešnost izolacije glive <i>C. fraxinea</i> in drugih gliv iz okuženih jesenovih poganjkov po toplotnih obdelavah v vodi marca 2011.....	41
Slika 17: Temperatura zraka, skorje in lesa, merjena na sadiki velikega jesena dne 23. avgusta 2011	42
Slika 18: Povprečno dnevno trajanje obdobjij s temperaturo lesa nad 30 in 36 °C	42
Slika 19: Premer kolonij glive <i>Chalara fraxinea</i> na gojiščih s tremi različnimi koncentracijami petih različnih aktivnih snovi. Prikazane so relativne vrednosti glede na rast glive na kontrolnih gojiščih	45
Slika 20: Premer kolonij glive <i>Chalara fraxinea</i> na gojiščih z različno vsebnostjo uree. Prikazane so relativne vrednosti glede na rast glive na kontrolnih gojiščih.....	47
Slika 21: Rast dveh različnih izolatov glive <i>C. fraxinea</i> na gojiščih z različno vsebnostjo uree. Izolat NEG je v primerjavi s kontrolnimi gojišči značilno manj rasel že na gojišču, ki mu	

je bil dodan 1 g uree, izolat SB pa je značilno slabše uspeval le na gojišču z največjo koncentracijo uree (10 g/l).....	49
Slika 22: Število razvitih apotecijev (modra) in površina trosovnic apotecijev (zelena) na kontrolnih pecljih in na pecljih, ki smo jih obdelovali z različnimi koncentracijami kaptana (zgoraj) in tirama (spodaj). Prikazana so povprečja in standardne napake	52
Slika 23: Število razvitih apotecijev (modra) ter povprečna površina trosovnic apotecijev (zelena) na kontrolnih pecljih in na pecljih, ki smo jih obdelovali z različnimi koncentracijami klorotalonila (zgoraj), prokloraza (sredina) in karbendazima (spodaj). Prikazana so povprečja in standardne napake	53
Slika 24: Razlika v številu in velikosti oblikovanih apotecijev na jesenovih pecljih, ki smo jih obdelovali z destilirano vodo (levo) oziroma z različnimi koncentracijami karbendazima: 0,1 mg/l (sredina) in 1 mg/l (desno)	54
Slika 25: Peclje, obdelane z večjimi koncentracijami uree, so prerasle druge glive. Med njimi so bile pogosto tudi koprinoidne glive	55
Slika 26: Število razvitih apotecijev na kontrolnih pecljih ter na pecljih, ki so bili obdelani z različnimi koncentracijami uree. Prikazana so povprečja in standardne napake	56
Slika 27: Koloniji gliv <i>C. fraxinea</i> in <i>Botryosphaeria dothidea</i> po treh tednih (levo) in treh mesecih (desno). Gliva <i>C. fraxinea</i> je vedno na levi strani petrijevke	57
Slika 28: Dvojne kulture glive <i>C. fraxinea</i> in gliv <i>Phomopsis</i> sp.1 (zgoraj), <i>Diaporthe viticola</i> (sredina) in <i>Coniophora</i> sp. (spodaj). Slike na levi strani so bile posnete po treh tednih rasti, slike na desni strani pa po treh mesecih. Gliva <i>C. fraxinea</i> je vedno na levi strani petrijevke	58
Slika 29: Dvojna kultura gliv <i>C. fraxinea</i> in <i>Bjerkandera adusta</i> . Po treh mesecih rasti je bilo mogoče opaziti, da <i>C. fraxinea</i> (na levi strani petrijevke) počasi prerašča kolonijo glive <i>B. adusta</i>	59
Slika 30: Inhibicijska cona med glivama <i>C. fraxinea</i> in <i>Epicoccum nigrum</i> (levo) ter <i>C. fraxinea</i> in <i>Fusarium</i> sp. (desno) po treh mesecih rasti. Gliva <i>C. fraxinea</i> je vedno na levi strani petrijevke	60
Slika 31: Gliva <i>Biscogniauxia nummularia</i> je kolonijo glive <i>C. fraxinea</i> (na levi strani petrijevke) prerasla na površini gojišča in po straneh petrijevke. <i>C. fraxinea</i> pa je v kolonijo glive <i>B. nummularia</i> vrasla po sredini, in sicer globlje v gojišču	60
Slika 32: Gliva <i>Hypocrea</i> sp. je zelo hitro popolnoma prerasla kolonijo glive <i>C. fraxinea</i> na levi strani petrijevke	60
Slika 33: Delež poškodovane krošnje 20 različnih klonov vrste <i>F. angustifolia</i> v letih 2009, 2010 in 2011	63
Slika 34: Delež poškodovane krošnje 20 različnih klonov vrste <i>F. angustifolia</i> leta 2012	64
Slika 35: Dolžina nekroz lesa, ki jih je povzročila gliva <i>C. fraxinea</i> po inokulaciji v vejice treh različnih klonov vrste <i>F. angustifolia</i>	64
Slika 36: Razlike v dolžini nekroz skorje in lesa (levo) in razlike v dolžini nekroz lesa, ki sta jih povzročila dva različna izolata glive <i>C. fraxinea</i> (desno).....	65

Slika 37: Delež osebkov posameznega klena po petih različnih stopnjah odpadanja listja avgusta, septembra in oktobra 2011.....	66
Slika 38: Novo razvito listje na enem izmed dreves, ki je že avgusta odvrglo večino listja (zgoraj), je v oktobru kazalo tipične nekroze jesenovega ožiga (desno).....	67
Slika 39: Korelacija med povprečnim deležem poškodovane krošnje julija 2011 in povprečno stopnjo odpadanja listja posameznih klonov avgusta, septembra in oktobra 2011.....	68
Slika 40: Delež osebkov posameznega klena po treh različnih stopnjah razvitosti brstov na dan 26. april 2012	69
Slika 41: Korelacija med povprečnim deležem poškodovane krošnje julija 2011 in povprečno stopnjo razvitosti brstov posameznih klonov na dan 26. april 2012	69
Slika 42: Tipične micelijske pahljačice gliv iz rodu <i>Armillaria</i> (levo) in nekroza, ki jo je na koreničniku povzročila gliva <i>C. fraxinea</i> (desno).....	70
Slika 43: Okužbe koreničnikov treh izbranih klonov vrste <i>F. angustifolia</i> z glivami iz rodu <i>Armillaria</i> spp. in glivo <i>C. fraxinea</i>	71
Slika 44: Korelacija med povprečnim deležem poškodovane krošnje in deležem okuženih koreničnikov treh izbranih klonov vrste <i>F. angustifolia</i>	71
Slika 45: Filogenetsko drevo izbranih vrst gliv iz rodu <i>Armillaria</i> , narejeno po analizi nukleotidnih zaporedij ITS rDNA z distančno metodo združevanja najbližjega soseda s programskim paketom MEGA5. Merilo predstavlja število nukleotidnih zamenjav. Z rdečo so označeni vzorci iz Hraščice, z modro pa vzorca iz jesenovega semenskega objekta Kropivnica pri Izlakah.....	72
Slika 46: Delež odmrle krošnje jesenovih dreves na devetih različnih lokacijah v Sloveniji (levo); delež odmrle krošnje jesenovih dreves različnih socialnih položajev, upoštevajoč vse lokacije (desno).....	74
Slika 47: Delež prezgodaj odpadlega listja iz jesenovih dreves na devetih različnih lokacijah v Sloveniji (levo); delež prezgodaj odpadlega listja z jesenovih dreves različnih socialnih položajev, upoštevajoč vse lokacije (desno).....	75
Slika 48: Muhe iz družine Sciaridae (zgoraj) oziroma njihove ličinke so požrle vse glive, ki so uspevale na pecljih v eni izmed petrijevk. Okoli pecljev so vidni iztrebki ličink (levo)..	84
Slika 49: Kolonije glive <i>C. fraxinea</i> so v dvojnih kulturah pogosto oblikovale kristalne skupke, ki naj bi vsebovali viridin in viridiol.....	86
Slika 50: Gliva <i>Hyalodendriella</i> sp. je že z relativno velike razdalje zavirala rast glive <i>C. fraxinea</i> ..	87
Slika 51: Gliva <i>Hypoxyylon howeanum</i> je v kulturah oblikovala kristalne skupke	87
Slika 52: Rovni sistemi pisanega jesenovega ličarja pod skorjo odmrlega poljskega jesena.....	91
Slika 53: Delež poškodovane krošnje v letu 2012. Kloni, ki naj bi bili identični, imajo tudi podobno poškodovane krošnje. Tri skupine identičnih klonov so obarvane s tremi različnimi barvami	93

Slika 54: Pogled na močno poškodovan sestoj na lokaciji Željne (zgoraj) in na manj poškodovan sestoj na lokaciji Konjiška gora (spodaj). Obe sliki sta bili posneti avgusta 2011	94
Slika 55: Micelijske pahljače in rizomorfi mraznice pod skorjo odmrlega jesena.....	95
Slika 56: Pot proti slapu Peračica na lokaciji Brezje je bila že avgusta prekrita s prezgodaj odpadlim okuženim jesenovim listjem	95

KAZALO PRILOG

PRILOGA A Shema semenske plantaže poljskega jesena (*F. angustifolia*) v Hraščici

OKRAJŠAVE

EPPO	Evropska organizacija za varstvo rastlin (European Plant Protection Organization)
GIS	Gozdarski inštitut Slovenije
KR	izolat glive <i>C. fraxinea</i> z lokacije Kranj
MEA	Sladni agar (Malt Extract Agar)
MEA+S	Sladni agar z dodatkom streptomicina (Malt Extract agar + Streptomycin)
NEG	izolat glive <i>C. fraxinea</i> iz lokacije Negova
PDA	Krompirjev agar (Potato Dextrose Agar)
RIB	izolat glive <i>C. fraxinea</i> z lokacije Ribnica
SB	izolat glive <i>C. fraxinea</i> z lokacije Sabansko bukovje
ZLVG	Zbirka laboratorija za varstvo gozdov

1 UVOD

Jeseni (*Fraxinus* spp.) so pomembni gradniki slovenskih gozdov. Veliki jesen (*Fraxinus excelsior* L.) in poljski jesen (*Fraxinus angustifolia* Vahl.) sta zaradi kakovostnega, trdega in trajnega lesa pomembni gospodarski drevesni vrsti. Zaradi specifičnih ekoloških zahtev naseljujeta bogata, globoka in vlažna tla, njuni sestoji pa sooblikujejo edinstveno pokrajino z veliko biotsko raznolikostjo. Mali jesen (*Fraxinus ornus* L.) je z vidika proizvodnje lesa nekoliko manj pomembna vrsta, ima pa neprecenljivo vlogo v pionirskih in varovalnih gozdovih.

Do nedavnega so jeseni veljali za drevesne vrste, ki so relativno odporne na bolezni. Pred slabimi dvajsetimi leti pa se je na SV Evropi začelo močno odmiranje in sušenje jesenov, ki se je do danes razširilo na večji del Evrope. Na najbolj prizadetih območjih je odmrlo že več kot 60 % jesenov (Jurc in Ogris, 2008). Povzročiteljica tako obsežne epifitocije je leta 2006 opisana gliva *Chalara fraxinea* T. Kowalski. Za širjenje bolezni in povzročanje novih okužb je pomemben predvsem njen teleomorf *Hymenoscyphus pseudoalbidus* Queloz in sod., ki je bil opisan šele leta 2011. Jesenov ožig, kot smo bolezen poimenovali pri nas, je tako eden najpomembnejših problemov varstva gozdov v Evropi, saj so po brestih, ki jih je prizadela holandska brestova bolezen, in po pravem kostanju, ki ga je prizadel kostanjev rak, zdaj v Evropi močno ogroženi tudi jeseni.

Leta 2006 je sušenje in odmiranje jesenov doseglo tudi Slovenijo, že v naslednjih dveh letih pa se je bolezen razširila na celotno območje države (Jurc in Ogris, 2008). Bolezen povzroča venenje in zgodnje odpadanje listja, nekroze listja, listnih pecljev, skorje in lesa, odmiranje in sušenje poganjkov ter rakave rane na poganjkih in vejah. Gliva *C. fraxinea* ogroža predvsem veliki in poljski jesen, medtem ko se zdi, da je mali jesen na bolezen odporen. Ogrožena so dovezeta drevesa vseh starosti, mortaliteta je večja med osebki mlajših razvojnih faz, oteženo je naravno pomlajevanje jesena, močno pa je otežena tudi pridelava zdravih sadik v gozdnih drevesnicah. Kljub vsemu pa nekateri jeseni vendarle kažejo določeno odpornost proti bolezni. V Sloveniji smo prve sanitarne sečnje zaradi jesenovega ožiga zabeležili spomladis leta 2009 (Ogris, 2009), leta 2012 je sanitarni posek jesena dosegel 4776 m^3 (Timber, 2012). Drugih podatkov o poškodovanosti jesenov zaradi jesenovega ožiga v Sloveniji ni, zato je bil prvi namen raziskave oceniti stopnjo poškodovanosti in hitrost propadanja jesenovih sestojev zaradi glive *C. fraxinea* pri nas.

Gliva *C. fraxinea* je primarni vzrok bolezni, pri odmiranju in propadanju jesenov v Evropi pa sodelujejo tudi drugi škodljivi organizmi, ki še pospešujejo propad. Namen te raziskave je bil spoznati celoten kompleks škodljivih organizmov, ki sodelujejo pri odmiranju jesenov, in spoznati druge dejavnike, ki vplivajo na razvoj jesenovega ožiga.

Učinkovitih načinov zatiranja glive *C. fraxinea* še ne poznamo. Kljub vsemu pa so nekatere raziskave in opazovanja na terenu nakazovala, da možnosti za razvoj določenih postopkov za zatiranje vendarle obstajajo. V naši raziskavi smo zato proučevali vpliv temperatur na glivo *C. fraxinea* in možnosti za toplotno zatiranje patogena. Poleg tega smo v laboratoriju testirali nekatere snovi, ki bi jih lahko uporabljali za kemično zatiranje glive, poskušali pa smo odkriti tudi njenega naravnega sovražnika, ki bi lahko služil za biološko zatiranje bolezni.

Preživetje populacij občutljivih vrst jesenov v prihodnosti je resno ogroženo, zato je še posebej pomembno odkritje domnevne individualne odpornosti posameznih jesenov, ki naj bi bila rezultat delovanja različnih obrambnih mehanizmov gostitelja (McKinney in sod., 2011; McKinney in sod., 2012b; Stener, 2013). To odkritje ima poseben pomen, ker bi obstoj individualne odpornosti namreč pomenil možnost križanja in selekcije na odpornost ter predstavlja rešitev za obstoj jesenov v naših gozdovih. Vse dosedanje raziskave individualne odpornosti se nanašajo na veliki jesen, mi pa smo domnevo o odpornosti posameznih osebkov kot tudi pomen različnih obrambnih mehanizmov proučevali v klonskem nasadu poljskega jesena v Hraščici.

Raziskovalne hipoteze našega dela so bile:

- Jesenov ožig je prisoten v vseh izbranih jesenovih semenskih sestojih po Sloveniji, vendar je stopnja poškodovanosti manjša kot v državah, kjer se je bolezen pojavila prej kot v Sloveniji.
- Obstaja veliko število škodljivih organizmov, ki lahko prizadenejo jesene. Predvsem na najbolj prizadetih območjih so poleg glive *Chalara fraxinea* prisotne tudi glive iz rodu *Armillaria* in hrošči iz poddružine Scolytinae.
- Obstajajo razlike v individualni odpornosti posameznih jesenov. Razlike so v poškodovanosti krošenj med različnimi kloni, poleg tega pa odpornejši kloni spomladi prej olistajo, jeseni prej odvržejo listje in v svojih tkivih bolje zavirajo rast patogena.
- S primerno toplotno obdelavo okuženih jesenovih sadik gliva *Chalara fraxinea* v okuženih tkivih odmre in sadika preživi.
- Tudi v naravi se lahko razvijejo toplotne razmere, ki ogrožajo preživetje glive *C. fraxinea*.
- Med kemičnimi sredstvi, ki se uporablajo za zatiranje sorodnih gliv, je tudi sredstvo, ki uspešno zatira glivo *C. fraxinea*.
- Obstaja antagonizem med glivo *C. fraxinea* in določenimi drugimi glivami, ki jih je mogoče izolirati iz poškodovanih jesenov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 RAZŠIRJENOST BOLEZNI IN POŠKODOVANOST JESENOVIH SESTOJEV V EVROPI

Simptomi jesenovega ožiga so se v Evropi najprej pojavili leta 1992 na Poljskem (Kowalski in Łukomska, 2005; Przybyl, 2002), kmalu zatem pa tudi v Litvi (Lygis in sod., 2005; Timmermann in sod., 2011). Bolezen se je nato hitro širila, do danes pa so o pojavu bolezni poročali še iz Avstrije (Cech, 2006; Kirisits in sod., 2009), Belgije (Chandelier in sod., 2011), Belorusije (Timmermann in sod., 2011; Kirisits in sod., 2009), Češke (Jankovsky in Holdenrieder, 2009), Danske (Thomsen in sod., 2007), Estonije (Drenkhan in Hanso, 2010), Finske (Rytkonen in sod., 2011), Francije (Iois in sod., 2009), Hrvaške (Barić in sod., 2012), Irske (First report..., 2013), Italije (Ogris in sod., 2010), Latvije (Rytkonen in sod., 2011), Madžarske (Szabo, 2009), Nemčije (Schumacher in sod., 2010; Schumacher in sod., 2007), Nizozemske (First report..., 2010), Norveške (Talgo in sod., 2009), Romunije (Timmermann in sod., 2011; Kirisits in sod., 2009), Rusije (Timmermann in sod., 2011; Kirisits in sod., 2009), Slovaške (Kunca in sod., 2011), Slovenije (Ogris in sod., 2009a), Švedske (Bakys in sod., 2009a), Švice (Engesser in sod., 2009), Velike Britanije (First report..., 2012) in Ukrajine (Davydenko in sod., 2013). Leta najdb prvih simptomov v posamezni državi so prikazana na sliki 1. V Sloveniji smo prve simptome bolezni opazili jeseni leta 2006 v Prekmurju. V letih 2007 in 2008 se je bolezen razširila na območje celotne države (Jurc in Ogris 2008; Ogris, 2008; Ogris in sod., 2009a).

V vseh zgoraj omenjenih državah se bolezen pojavlja na velikem jesenu (*Fraxinus excelsior* L.), v Sloveniji (Ogris, 2009), Avstriji (Kirisits in sod., 2010), Nemčiji (Schumacher in sod., 2007), Italiji (Montecchio, ustna informacija) ter na Madžarskem (Koltay in sod., 2012), Češkem (Jankovsky in Holdenrieder, 2009) in Hrvaškem (Barić in sod., 2012) pa tudi na poljskem jesenu (*F. angustifolia* Vahl.). Poškodbe zaradi glive *C. fraxinea* na malem jesenu (*F. ornus* L.) v naravi še niso bile odkrite, so pa na listnih pecljih te vrste odkrili trosišča patogena (Gross in sod., 2014). Določena stopnja občutljivosti malega jesena je bila dokazana tudi v testih patogenosti (Kirisits in sod., 2009), v katerih je bila gliva inokulirana v različne vrste jesena. Testi patogenosti so tudi pokazali, da je poljski jesen nekoliko občutljivejši od velikega jesena (Kirisits in sod., 2009; Ogris, 2009). Raziskava v Estoniji je pokazala, da so gostiteljske vrste glive *C. fraxinea* tudi nekatere neevropske vrste jesena, in sicer *F. nigra* Marsh., *F. pennsylvanica* Marsh., *F. americana* L. in *F. mandschurica* Rupr. (Drenkhan in Hanso, 2010).

Bolezen se pojavlja na jesenih vseh starostih in na različnih tipih rastišč. Intenzivnost poškodb je večja na drevesih mlajših razvojnih faz in na bolj vlažnih rastiščih z relativno nizkimi temperaturami. Močno oteženo je pomlajevanje jesena, skoraj onemogočena pa je tudi pridelava zdravih jesenovih sadik v gozdnih drevesnicah (Kirisits in sod., 2009;

Kowalski in Łukomska, 2005; Ogris, 2008; Schumacher in sod., 2010). starejša drevesa so na bolezen odpornejša oziroma se lahko bolezni dolgo uspešno zoperstavlajo. Pogosto pa jih jesenov ožig oslabi do te mere, da postanejo veliko dovetnejša za okužbe oziroma napade sekundarnih škodljivih organizmov, ki proces propadanja jesenov zelo pospešijo (Bakys in sod., 2011; Husson in sod., 2012; Keßler in sod., 2012; Kirisits in Freinschlag, 2012; Kunca in sod., 2011; Skovsgaard in sod., 2010). Med te organizme sodijo predvsem glive iz rodu *Armillaria* in jesenovi podlubniki (Coleoptera: Scolytinae). Iz nekaterih evropskih držav poročajo, da v procesu propadanja jesenov sodelujejo tudi glive iz rodu *Phytophthora* (Orlikowski in sod., 2011). Te glive so sicer vzrok odmiranja jesenov tudi na območjih, kjer gliva *C. fraxinea* še ni prisotna (Akilli in sod., 2013).



Slika 1: Razširjenost velikega jesena (*Fraxinus excelsior*) v Evropi in leta najdb prvih simptomov jesenovega ožiga v posameznih državah (Bengtsson, 2013; Ash species..., 2005)

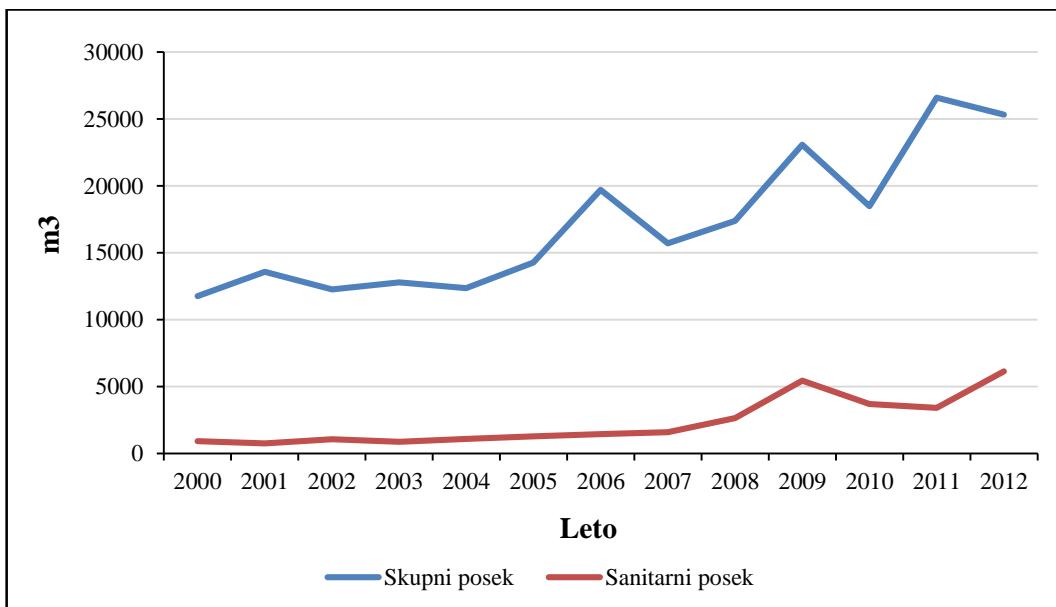
Figure 1: Distribution map of common ash in Europe and years of first ash dieback symptoms observations in particular country (Bengtsson, 2013; Ash species..., 2005)

Jesenov ožig je do zdaj največ škode povzročil na območjih, kjer se je bolezen najprej pojavila. V Litvi je bilo že v letu 2009 30–40 % jesenovih sestojev predvidenih za golosečnjo (Lygis in sod., 2009), površina jesenovih sestojev pa se je od leta 1995 do leta 2011 zmanjšala s 50800 na 36300 hektarjev (Bakys, 2013). Po podatkih iz stalnih raziskovalnih

ploskev v Litvi letno odmre približno 10 % jesenov (Pliura in sod., 2012). Podobno se je tudi v Latviji površina jesenovih sestojev med letoma 2000 in 2007 zmanjšala za več kot 5000 hektarov oziroma 23 % (Kenigsvalde in sod., 2010).

V naši bližini bolezen še ni povzročila toliko škode. V Avstriji, kjer je bolezen prisotna od leta 2005, poškodovanost jesenovih sestojev natančneje spremljajo na 14 izbranih raziskovalnih ploskvah v Spodnji Avstriji (Keßler in sod., 2012). Leta 2008 je povprečna poškodovanost jesenovih krošenj zaradi jesenovega ožiga na izbranih ploskvah znašala med 1 in 34 % (v povprečju 11 %), leta 2010 pa med 2 in 38 % (v povprečju 16 %). Mortaliteta je bila majhna, saj so od 280 popisanih dreves odmrla le tri. Pri tem je treba poudariti, da monitoring poteka v relativno starih sestojih in da je poškodovanost mlajših sestojev veliko večja. Raziskava na Bavarskem je na primer pokazala, da je bila leta 2012 mortaliteta v izbranih odraslih jesenovih sestojih okoli 2 %, v sestojih v razvojni fazi drogovnjaka 26 %, na površinah v pomlajevanju pa celo 43 % (Metzler in sod., 2012).

Kot smo omenili, smo simptome jesenovega ožiga v Sloveniji prvič opazili jeseni leta 2006. Natančnejših podatkov o poškodovanosti jesenovih sestojev pri nas do zdaj ni bilo, se pa prisotnost bolezni v zadnjih letih kaže v povečani skupni količini posekanega lesa obeh občutljivih vrst jesena pri nas (slika 2).



Slika 2: Skupni in sanitarni posek velikega in poljskega jesena v Sloveniji (Timber, 2000–2012)

Figure 2: Total and sanitary felling of common and narrow-leaved ash in Slovenia (Timber, 2000–2012)

Jesenov ožig poleg svojih gostiteljev posredno ogroža tudi druge organizme. Na Švedskem so na primer skupaj z velikim jesenom (*F. excelsior*) na rdeči seznam ogroženih vrst že uvrstili 60 drugih vrst (večinoma žuželk in lišajev), ki so od te drevesne vrste tako ali drugače

odvisne (Gärdenfors, 2010, cit. po Bengtsson, 2013). Raziskave poleg tega kažejo, da povzročiteljica jesenovega ožiga zaradi večje konkurenčnosti na okuženih območjih izpodriva naravno prisotno glivo *Hymenoscyphus albidus*, za katero domnevajo, da je na nekaterih območjih krajevno lahko že izumrla (McKinney in sod., 2012a).

2.2 GLIVA, POVZROČITELJICA JESENoveGA OŽIGA

2.2.1 Iskanje povzročitelja in odkritje nove vrste

Čeprav se je obsežno sušenje in odmiranje jesena v Evropi začelo že v 90. letih prejšnjega stoletja (Kowalski in Łukomska, 2005; Lygis in sod., 2005; Przybyl, 2002), je bila gliva povzročiteljica tega pojava prvič opisana šele leta 2006. Pred tem so kot primarni vzrok propadanja omenjali abiotske dejavnike (zmrzal, suša, nenadna temperaturna nihanja), ki naj bi oslabili jesene do te mere, da so jih lažje okužili različni šibko patogeni organizmi (Przybyl, 2002; Pukacki in Przybyl, 2005). Z odmiranjem jesenov so povezovali tudi glive iz rodu *Armillaria* (Lygis in sod., 2005), vendar se je kasneje izkazalo, da je pojav teh gliv na oslabljenih jesenih sekundarnega značaja (Bakys in sod., 2009). Iz obolelih jesenovih tkiv so uspešno izolirali mnogo vrst gliv, med katerimi so bile tudi nekatere rahlo patogene, predvsem iz rodov *Cytospora*, *Diplodia*, *Fusarium* in *Phomopsis* (Kowalski in Łukomska, 2005; Przybyl, 2002). Iz obolelih jesenov je bila pogosto izolirana tudi do tedaj neopisana gliva iz rodu *Chalara* (Przybyl, 2002; Kowalski, 2006). Še posebej velika je bila uspešnost izolacije omenjene glive iz tkiv, ki so kazala začetni stadij okužbe. To je že nakazovalo, da bi gliva iz rodu *Chalara* lahko bila povzročiteljica jesenovega ožiga, z njenim opisom in dokazom njene patogenosti pa sta Kowalski in Holdenrieder (2009a) to domnevo tudi potrdila. V Sloveniji smo glivo *C. fraxinea* iz okuženih tkiv prvič uspešno izolirali leta 2007, istega leta pa smo dokazali tudi njeno patogenost (Ogris in sod., 2009a).

Gliva *C. fraxinea* oblikuje 16–24 µm dolge fialide, v katerih se oblikujejo konidiji, ki se izločajo v obliki verige ali pa sluzastih kapljic (slika 3). Prvi konidiji, ki jih oblikujejo fialide, so večji kot kasneje oblikovani konidiji in merijo 6–7 × 2,2–2,5 µm, kasneje oblikovani konidiji pa merijo 3,2–4,0 × 2,2–2,5 µm (Kowalski, 2006). V naravi se omenjene konidiogene celice (fialide) oblikujejo pri nižjih temperaturah jeseni, in sicer najpogosteje na odpadlih listnih pecljih (Kowalski in Bartnik, 2010), redkeje pa na vejicah in deblih okuženih jesenov (Husson in sod., 2012; Kowalski in Holdenrieder, 2009a). Tudi v čisti kultiuri glive izpostavljenost nižjim temperaturam (5–15°C) pospeši sporulacijo glive (Kirisits in sod., 2009; Kowalski in Bartnik, 2010).

Z odkritjem glive *C. fraxinea* T. Kowalski je bil torej ugotovljen povzročitelj jesenovega ožiga, še vedno pa je ostalo nepojasnjeno izjemno hitro širjenje bolezni v Evropi. Konidiji, ki jih oblikuje gliva *C. fraxinea*, so namreč lepljivi in sluzasti ter tako ne omogočajo hitrega

širjenja na velike razdalje npr. z vetrom (Jurc, 2009), poleg tega so se izkazali za nekalive (Kirisits in sod., 2009). Konidiji torej ne morejo povzročati novih okužb, raziskave pa kažejo na to, da v razvojnem krogu igrajo pomembno vlogo pri oblikovanju teleomorfa glive (Gross in sod., 2012b). Cleary in sod. (2013) so ugotovili, da gliva konidije v obliki verig oblikuje tudi takoj po uspešni okužbi listja.



Slika 3: Fialide in konidiji glive *Chalara fraxinea*

Figure 3: Phialides and conidia of the fungus *Chalara fraxinea*

2.2.2 Odkritje teleomorfa

Obstoj teleomorfa glive so nakazovale že velike morfološke razlike kultur glive *C. fraxinea*, ki lahko nastanejo predvsem v procesih mejoze oziroma spolnega razmnoževanja (Jurc, 2009). Teleomorf povzročiteljice jesenovega ožiga je bil odkrit leta 2008 (Kowalski in Holdenrieder, 2009b). Sprva so spolna trosiča, ki jih gliva oblikuje na odpadlih listnih pecljih iz prejšnjega leta, pripisali glivi *Hymenosyphus albidus* (Roberge ex Desm.) W. Philips, vendar so molekularne analize kasneje pokazale, da gre za novo vrsto glive, ki so ji nadeli ime *Hymenosyphus pseudoalbidus* V. Queloz, C. R. Grünig, R. Berndt, T. Kowalski, T. N. Sieber & O. Holdenrieder (2011). V Sloveniji smo teleomorf prvič odkrili maja 2009, glivo *H. pseudoalbidus* pa v slovenščini poimenovali neprava pecljevka (Ogris, 2009; Piškur, 2010).

Trosiča glive *H. pseudoalbidus* so apoteciji (slika 4), pri katerih premer diskaste trosovnice meri 1,5–3 mm, bet pa je visok 0,4–2 mm. Trosiča so sprva bela, kasneje smetanasta v starosti pa cimetasta. Bet je spodaj temnejši. Na mestih, kjer se tvorijo apoteciji, je pogosto oblikovana tudi črna psevdosklerocijska plošča (Jurc, 2009; Kowalski in Holdenrieder, 2009b). V apotecijih se oblikujejo $80\text{--}107 \times 8\text{--}10 \mu\text{m}$ veliki aski (slika 5), vsak izmed njih pa vsebuje osem askospor (slika 5), ki merijo $13\text{--}17 (21) \times 3,5\text{--}5 \mu\text{m}$ (Kowalski in Holdenrieder, 2009b).



Slika 4: Apotecija glive *H. pseudoalbidus* na odpadlem listnem peclju velikega jesena (*F. excelsior*)

Figure 4: Apothecia of fungus *H. pseudoalbidus* on fallen leaf petiole of common ash (*F. excelsior*)

Sprva je kazalo, da je teleomorf povzročiteljice jesenovega ožiga morfološko povsem identičen glivi *H. albidus*. Nadaljnje raziskave so pokazale, da gliva *H. pseudoalbidus* v povprečju oblikuje večje askospore, nekoliko večja pa so tudi njena trosiča (Queloz in sod., 2011; Solheim in sod., 2011). Zhao in sod. (2012) navajajo, da je tipičen znak za razlikovanje omenjenih vrst prisotnost kljuk (ang. crozier), ki jih gliva *H. pseudoalbidus* oblikuje ob bazi askov, gliva *H. albidus* pa ne. Največja razlika med vrstama pa je ta, da gliva *H. albidus* ne oblikuje nespolnih trosičev oziroma anamorfa (Kirisits in sod., 2013).



Slika 5: Ask (levo) in askospore (desno) glive *H. pseudoalbidus*

Figure 5: Ascus (left) and ascospores (right) of fungus *H. pseudoalbidus*

2.2.3 Iskanje izvora glive *H. pseudoalbidus*

Ob najdbi teleomorfa so bile postavljene hipoteze o izvoru bolezni (Jurc, 2009; Kowalski in Holdenrieder, 2009b). Številni raziskovalci so bili mnenja, da bolezen povzroča invazivna tujerodna gliva (Husson in sod., 2011; Queloz in sod., 2011; Timmermann in sod., 2011). Ker se zdi mali jesen (*F. ornus*) na bolezen odporen in je soroden mnogim azijskim vrstam jesenov, so predvidevali, da je bila gliva v Evropo vnesena iz Azije (Queloz in sod., 2011). Kakor koli, velika znotraj vrstna raznolikost glive, ugotovljena na podlagi markerjev RAMS (Kraj in sod., 2011; Rytkonen in sod., 2011), te hipoteze ni potrdila, je pa bolj kazala na možnost, da je patogena populacija glive nastala iz prisotne nepatogene populacije, in sicer kot posledica hibridizacije oziroma mutacije (Piškur, 2010; Rytkonen in sod., 2011). Povsem drugačna in manj verjetna pa je bila hipoteza, ki je predvidevala povečanje patogenosti glive oziroma zmanjšanje odpornosti gostitelja zaradi okoljskih sprememb.

Nedavne raziskave populacijske genetike glive *H. pseudoalbidus* na podlagi polimorfnih mikrosatelitskih markerjev so pokazale majhno genetsko variabilnost med in znotraj populacij glive v Evropi (Bengtsson in sod., 2012; Gross in sod., 2012a). Rezultati so nakazovali na t. i. učinek ustanovitelja (ang. founder effect) oziroma na to, da je genetsko relativno homogena evropska populacija glive *H. pseudoalbidus* nastala iz v Evropo

vnesenega manjšega dela večje in genetsko pestrejše populacije glive, ki je sicer prisotna nekje drugje (Bengtsson in sod., 2012). Gross in sod. (2012b) so odkrili, da je vrsta *H. pseudoalbidus* heterotalična, v isti raziskavi pa so ugotovili tudi, da lahko v okuženem jesenovem peclju odkrijemo tudi do osem različnih genotipov glive. Prav ta dejstva naj bi bila ključna za to, da kljub relativno kratki prisotnosti glive v Evropi lahko z nekaterimi molekularnimi metodami že odkrijemo določeno stopnjo raznolikosti v okviru vrstne raznolikosti.

Domneve, da jesenov ožig povzroča vnesena gliva, so se kmalu potrdile. Zhao in sod. (2012) so namreč odkrili, da je gliva *H. pseudoalbidus* identična glivi *Lambertella albida* (Gillet) Korf, ki se pojavlja na pecljih vrste *Fraxinus mandshurica* na Japonskem (rezultati raziskave so pokazali tudi, da je uvrstitev glive v rod *Hymenoscyphus* bolj primerna od uvrstitve v rod *Lambertella*). Pred kratkim je bilo ugotovljeno, da je gliva razširjena tudi na Kitajskem (Zheng in Zhuang, 2014). Populacije glive *H. pseudoalbidus* na Japonskem in Kitajskem so v primerjavi z evropsko populacijo genetsko mnogo bolj raznolike, kar je v skladu s teorijo učinka ustanovitelja. V skladu s hipotezo, da gliva najverjetneje izvira iz Azije, je tudi dejstvo, da so lokalne vrste jesenov na bolezen zelo odporne. Kljub temu bodo za natančno določitev izvora glive *H. pseudoalbidus* potrebne nadaljnje genetske analize populacij iz različnih predelov Azije (Zhao in sod., 2012).

2.3 RAZVOJNI KROG IN SIMPTOMI BOLEZNI

Kot smo omenili, se apoteciji večinoma oblikujejo na odpadlih jesenovih listnih pecljih prejšnjega leta, redkeje pa se pojavijo na poganjkih in tanjših vejah (Kirisits in Cech, 2009; Kowalski in Holdenrieder, 2009b). Pomembno vlogo pri razvoju apotecijev kot tudi izmetavanju askospor igra vlaga (Cleary in sod., 2013b; Gross in sod., 2012b; Kirisits in sod., 2009; Timmermann in sod., 2011). Raziskave na Norveškem so pokazale, da je koncentracija askospor v zraku največja med šesto in osmo uro zjutraj. To je značilno za glive, ki aktivno sproščajo svoje trose (Hietala in sod., 2013; Timmermann in sod., 2011). Askospore najverjetneje dozorijo ponoči, ko je za to dovolj vlage, prav tako pa jutranja rosa ozziroma zračna vlaga v času izmetavanja trosov te varuje pred izsušitvijo in omogoča nove okužbe. Čas pojavljanja apotecijev je odvisen od zemljepisne širine, nadmorske višine ter klimatskih ozziroma vremenskih razmer (Kräutler in Kirisits, 2012; Timmermann in sod., 2011). Večinoma se oblikujejo med junijem in septembrom, v Sloveniji in Avstriji pa se ob ustreznih vremenskih razmerah pojavijo že maja ozziroma jih je mogoče najti tudi še v oktobru (Cleary in sod., 2013b; Hietala in sod., 2013; Kirisits in sod., 2009; Ogris, 2009; Timmermann in sod., 2011).

Kmalu po odkritju teleomorfa so se pojavile domneve, da so mesta primarnih okužb jesenov večinoma listi in listni peclji gostitelja ter da te okužbe opravijo askospore, ki jih na daljše

razdalje prenaša veter (Kirisits in sod., 2009; Timmermann in sod., 2011). To je nedavno potrdila raziskava, ki so jo izvedli na Švedskem (Cleary in sod., 2013b). Ta raziskava je pokazala, da askospore na površini listja kalijo, klične hife pa nato ob stiku z listno površino oblikujejo apresorije. Apresoriji nato tvorijo sluzasto snov, ki domnevno encimatsko omehča povrhnjico, tako, da prodorni klin povrhnjico in celično steno lažje predre. Hife medcelično prehajajo skozi piknje, naselijo pa lahko vse tipe celic. Rezultat teh okužb so nekroze listja in listnih pecljev (slika 6), pogosto pa okuženo listje predčasno odpade.



Slika 6: Nekroza listnega peclja velikega jesena, ki jo je povzročila gliva *C. fraxinea* (foto: N. Ogris)

Figure 6: Necrosis of common ash leaf petiole caused by *C. fraxinea* (foto: N. Ogris)

Gliva se iz listja oziroma listnih pecljev razraste v poganjke in veje, vendar je delež okužb listja, ki povzroči okužbo poganjka oziroma veje, relativno majhen (Kräutler in Kirisits, 2012). Večina okuženega listja naj bi domnevno odpadla, preden naj bi se glivi uspelo razširiti v poganjek. S proučevanjem kolonizacije lesa (po inokulaciji v poganjke triletnih jesenovih sadik) je bilo ugotovljeno, da se gliva od vstopnega mesta intracelularno razrašča v vsa tkiva in v vse smeri, ter da občasno oblikuje znotrajhifne hife (Dal Maso in sod., 2012; Schumacher in sod., 2010). Iste raziskave so pokazale, da se gliva zelo hitro širi vzdolžno znotraj debelc, še najhitreje po prevodnih sistemih in strženu. Istočasno se nekoliko počasneje radialno širi navzven proti kambiju in skorji, kjer omogoči razvoj številnim drugim glivam. Prav zaradi razvoja drugih gliv pa je uspešnost izolacije glive *C. fraxinea* iz skorje veliko manjša od uspešnosti izolacije iz lesa. V skladu z omenjenim načinom širjenja so tudi ugotovitve raziskav v Sloveniji (Ogris in sod., 2009a). Po inokulaciji glive *C. fraxinea* v vejice jesenov so bile namreč nekroze lesa značilno daljše od nekroz skorje.

Na poganjkih, vejah in debelcih gliva torej povzroča nekroze skorje inobarvanost lesa (slika 7), kar povzroči sušenje listja in odmiranje krošnje (slika 8). Gostitelj na okužbo in poškodbe

krošnje pogosto reagira z oblikovanjem adventivnih poganjkov. Raziskava na Švedskem je pokazala, da se je gliva zmožna širiti v drevesu v teku celega leta, tudi v obdobju, ko je bila temperatura dva meseca pod 0 °C (Bengtsson, 2013). Če se gostitelj uspešneje zoperstavi razraščanju glive, se na okuženih poganjkih ozioroma vejah oblikujejo rakave rane. Rast glive v gostitelju in s tem nastanek rakavih ran pa domnevno lahko povzročijo tudi druge glive, ki v okuženih jesenovih tkivih zaustavijo ali ovirajo rast in nadomestijo glivo *C. fraxinea*, vendar same niso zmožne kolonizirati zdravega jesenovega tkiva (Bengtsson, 2013).



Slika 7: Gliva *C. fraxinea* je povzročila nekroze skorje (levo) in obarvanost lesa (desno). Na sliki (levo) je vidna tudi listna brazgotina, kjer je gliva domnevno iz okuženega lista prišla v debelce

Figure 7: Fungus C. fraxinea caused bark necrosis (left) and staining of wood (right). Leaf scar (left) was probably place where fungus from diseased leaf entered into the stem

Pomembno vlogo pri širjenju glive v tkivih gostitelja imajo morda tudi njeni sekundarni metaboliti. Gliva proizvaja fungistatično snov viridin, ki jo lahko pretvori v fitotoksično snov viridiol (Andersson in sod., 2010; Grad in sod., 2009). Slednja je v teh raziskavah na sejankah ozioroma sadikah velikega jesena povzročila simptome, ki so bili povsem identični simptomom, ki jih povzroča gliva *C. fraxinea*. Najnovejše raziskave pa kažejo na to, da viridiol ni najpomembnejši dejavnik virulence glive *C. fraxinea* (Junker in sod., 2014). Korelacije med koncentracijo viridiola, ki so jo v kulturnah proizvedli različni izolati glive, in patogenostjo istih izolatov namreč niso odkrili. Vseeno pa so Junker in sod. (2014) ugotovili, da gliva proizvaja nekatere druge snovi, ki pomembno vplivajo na patogenost glive. Povzročiteljica jesenovega ožiga sicer dokazano proizvaja tudi nekatere druge steroide in steroidom podobne snovi, vendar njihovi morebitni toksični vplivi še niso raziskani (Andersson in sod., 2013; Andersson in sod., 2012; Bengtsson, 2013). Pham in sod. (2013)

so odkrili, da patogen proizvaja tudi do sedaj nepoznane sekundarne metabolite, ki naj bi bili značilni samo za vrsto *C. fraxinea*. Schumacher in sod. (2010) pa so dokazali, da ima gliva *C. fraxinea* tudi določeno zmožnost razgradnje lesa.



Slika 8: Odmiranje krošnje velikega jesena zaradi okužbe z glivo *C. fraxinea*

Figure 8: Crown dieback of common ash caused by *C. fraxinea*

Nekroze poganjkov in vej se torej večinoma širijo iz listnih brazgotin (slika 7), kjer je bilo pritrjeno okuženo listje. Ker je mogoče odkriti tudi nekroze, ki niso povezane z listnimi brazgotinami, so Kirisits in sod. (2009) domnevali, da askospore lahko okužijo poganjke tudi neposredno in ne samo posredno skozi listje. Raziskava v Franciji je pokazala, da gliva *C. fraxinea* povzroča nekroze tudi na korenčnikih dreves (Husson in sod., 2012). Predvidevajo, da v teh primerih gliva gostitelja okuži skozi lenticelle v skorji.

Gliva na odpadlih okuženih listnih pecljih oblikuje značilno črno psevdosklerocijsko ploščo, v obliki katere prezimi (Gross in sod., 2012b; Kowalski in Holdenrieder, 2009b). Jeseni se na okuženih pecljih oblikujejo fialide, ki oblikujejo konidije. Ti imajo v procesu spolnega razmnoževanja funkcijo spermacijev in tako sodelujejo v procesu razvoja apotecijev, ki naslednjo pomlad oblikujejo askospore. Število apotecijev, ki se razvijejo na okuženih območjih, je zelo veliko. Tako so na Norveškem julija na m² površine tal našeli tudi do 8300 trosišč (Hietala in sod., 2013).

2.4 MOŽNOSTI ZATIRANJA GLIVE

Možnosti za zatiranje oziroma obvladovanje jesenovega ožiga so zelo omejene (Kirisits in Freinschlag, 2012; Kirisits in sod., 2009). Širjenje glive s pomočjo človeka sicer lahko preprečimo s prepovedjo premeščanja okuženega rastlinskega materiala, vendar pa se patogen z askosporami zelo učinkovito in hitro širi po zraku z vetrom (Pautasso in sod., 2013). Da bi zmanjšali inokulum, bi lahko na urbanih površinah in v drevesnicah okuženo listje pred pojavom apotecijev pograbili in ga nato zakopali v zemljo ali uničili s sežigom (Barić in sod., 2012; Kirisits in sod., 2009).

V drevesnicah pri pridelavi sadik, v urbanem okolju oziroma za zaščito kakšnih posebej pomembnih (zavarovanih) dreves ali pa na razmejenih manjših območjih, kjer je eradikacija bolezni morda še mogoča, bi za zatiranje glive lahko uporabili fitofarmacevtska sredstva. Objav o učinkovitih fungicidih, ki bi zatirali glivo *C. fraxinea*, nismo našli. V nadaljevanju predstavljam krajši pregled kemičnega zatiranja nekaterih gliv, ki prav tako kot povzročiteljica jesenovega ožiga spadajo v red Helotiales.

Iz omenjene skupine gliv je kot patogen gozdnega drevja med najbolj poznanimi gliva *Gremmeniella abietina* (Lagerb.) Morelet. Raziskava v Španiji je pokazala, da to glivo najučinkoviteje zatira aktivna snov klorotalonil oziroma kombinacija aktivnih snovi klorotalonila in karbendazima (Santamaría in sod., 2007). Uporabo zgolj klorotalonila oziroma klorotalonil v kombinaciji z drugo aktivno snovjo predlagajo tudi nekatere starejše raziskave iz Amerike (Hopkin in McKenney, 1995; Skilling in sod., 1984). Povzročiteljici jesenovega ožiga sorodna je tudi gliva *Blumeriella jaapii* (Rehm) Arx, ki povzroča češnjevo listno pegavost in v Sloveniji večjo škodo povzroča tudi v gozdnih drevesnicah (Jurc, 2000). Skozi zgodovino so se proti tej bolezni uporabljala in se še uporablajo številna sredstva¹ (Holb in sod., 2010). Priročnik o fitofarmacevtskih sredstvih priporoča (Milevoj in sod., 1999) uporabo aktivnih snovi benomil, dodin, bitertanol, mankozeb in prokloraz, dejansko pa so trenutno v Sloveniji za zatiranje omenjene bolezni registrirana samo sredstva z aktivnima snovema mankozeb in prokloraz (Seznam ..., 2013). Nekatere glive iz redu Helotiales povzročajo škodo v sadjarstvu. Vsekakor velja omeniti glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel, *Monilinia laxa* (Aderh. & Ruhland) Honey, *Monilinia fructigena* Honey in druge povzročiteljice sadnih gnilob (*Monilinia* spp.). Iz seznama registriranih fitofarmacevtskih sredstev (Seznam..., 2013) lahko razberemo, da se proti glivi *B. fuckeliana* uporablajo sredstva z aktivnimi snovmi boskalid, tuberkonazol in pirimetanil, proti glivi *M. laxa* učinkujejo aktivne snovi difenkonazol, prokloraz, fenheksamid, tiofanatmetil in nekatera sredstva na osnovi bakra, za zatiranje glive *M. fructigena* so registrirana sredstva z aktivnimi snovmi fenheksamid, tiram in penkonazol, za druge monilije pa sredstva z aktivnimi snovmi ciprodinil, iprodion, fenheksamid in kaptan.

¹ Zaradi prevelikih negativnih vplivov na okolje so uporabo nekaterih sredstev oziroma aktivnih snovi prepovedali. Nekaterih sredstev ne uporablajo več, ker je gliva razvila odpornost in niso več učinkovita.

Za zatiranje prej omenjene glive *Blumeriella jaapii* se uporablja tudi urea (Bengtsson in sod., 2006; Green in sod., 2006). Podobno kot pri jesenovem ožigu tudi v razvojnem krogu češnjeve listne pegavosti pomembno vlogo igrajo trosi, ki se spomladi razvijejo na odpadlem okuženem listju. Nanos uree na odpadlo okuženo listje pospeši razgradnjo listja in posledično spomladi zmanjša produkcijo konidijev in askospor (Green in sod., 2006). Urea se sicer uporablja tudi za zatiranje jablanovega škrlupa (Sutton in sod., 2000), ki ga povzroča gliva *Venturia inaequalis* (Cook) Wint. in tudi borovega trohnobneža, glive *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref., ki velja za enega najnevarnejših patogenov iglavcev (Johansson in sod., 2002). V primeru zatiranja glive *H. annosum* se sicer z ureo ne obdela listja, temveč se po sečnji poškropijo panji.

Glive oziroma druge organizme, ki kažejo antagonizem do določenega patogena, lahko uporabimo za namene biološkega zatiranja. Tako lahko npr. za zatiranje prej omenjene glive *H. annosum* panje iglavcev namesto z ureo obdelamo s trosi glive *Phlebiopsis gigantea* (Fr.) Jülich (Agrios, 1997). Glivo *C. fraxinea* v okuženih jesenovih tkivih domnevno lahko zavirajo in nadomestijo drugi mikroorganizmi (Bengtsson, 2013; Kowalski in Holdenrieder, 2009a). Iz okuženih jesenovih tkiv so poleg glive *C. fraxinea* izolirali številne druge glive (Bakys in sod., 2009a; Bakys in sod., 2009b; Bakys in sod., 2011; Davydenko in sod., 2013; Kowalski in Holdenrieder, 2009a; Kowalski in Łukomska, 2005; Lygis in sod., 2005; Przybyl, 2002). Najpogosteje so bile to glive iz rodov *Alternaria*, *Phomopsis*, *Epicoccum* in *Diplodia*. Interakcije med temi organizmi sicer še niso natančneje raziskane, se pa v dvojnih kulturah med povzročiteljico jesenovega ožiga in nekaterimi glivami oblikujejo inhibicijske cone (Kowalski in Bartnik, 2010; Kowalski in Holdenrieder, 2009a). Naravnii antagonisti glive torej po vsej verjetnosti obstajajo, vprašanje pa je, ali je domnevne antagoniste mogoče uspešno uporabiti za namene biološke kontrole.

Glede na to, da se je gliva *C. fraxinea* zmožna razraščati po tkivih gostitelja tudi pri temperaturah, nižjih od 0 °C (Bengtsson, 2013; McKinney in sod., 2012b), in da oblikuje konidije jeseni pri nizkih temperaturah (Gross in sod., 2012b; Kowalski in Bartnik, 2010), jo lahko označimo za vrsto, ki je relativno dobro prilagojena na nizke temperature. Po drugi strani so raziskave na Poljskem pokazale, da je rast glive pri 30 °C zelo omejena (Kowalski in Bartnik, 2010). Tudi naša opazovanja na terenu so pokazala, da je intenzivnost bolezni večja na zasenčenih mestih z relativno nižjimi temperaturami (Ogris, 2008). Vsa ta dejstva kažejo na to, da bi za zatiranje glive *C. fraxinea* lahko uporabili toploto.

Toplotno obdelavo se pogosto uporablja za zatiranje rastlinskih bolezni in škodljivcev. Postopek sušenja lesa v komori (t. i. *kiln drying*) se na primer pred premeščanjem uporablja za les in lesni pakirni material. Pogosto se toplotno obdela tudi različne pridelke (cvetje, sadje in zelenjava) po spravilu (Lurie, 1998). Toplota oziroma vročina se uporablja tudi za sterilizacijo zemlje pred setvijo oziroma sajenjem določenih rastlin (Agrios, 1997). Toplotno pa se obdeluje tudi rastlinski reprodukcijski material in celo žive rastline. V gozdarstvu je

najbolj poznan primer obdelave želoda v topli vodi za namene zatiranja glive *Ciboria batschiana* (Zopf) Buchwald (Delatour in Morelet, 1979; Delatour in sod., 1982; Knudsen in sod., 2004; Schroder, 2002). Toplotna obdelava z vodo se sicer uporablja tudi za zatiranje različnih škodljivcev in bolezni vinske trte (Waite in May, 2005; Waite in Morton, 2007), prav tako pa s toplo oziroma vročo vodo pred glivo *Rosellinia necatrix* Prillieux ščitijo koreninske sisteme japonskih hrušk (Eguchi in sod., 2008).

2.5 INDIVIDUALNA ODPORNOST POSAMEZNIH JESENOV

V okuženih jesenovih sestojih je bilo med množico močno poškodovanih dreves vedno odkritih tudi nekaj manj poškodovanih dreves (Kirisits in sod., 2009; McKinney in sod., 2011; Stener, 2013). To je nakazovalo, da med posameznimi osebki obstajajo razlike v odpornosti na jesenov ožig. Ker domnevna individualna odpornost predstavlja morda edino pravo rešitev za obstoj jesenov v evropskih gozdovih, je bilo v zadnjih letih veliko raziskav namenjenih prav preverjanju te domneve.

McKinney in sod. (2011) so individualno odpornost posameznih osebkov proučevali v dveh klonskih plantažah velikega jesena (*F. excelsior*). Med letoma 2007 in 2009 so popisovali poškodovanost ramet posameznih klonov zaradi glive *C. fraxinea*. Rezultati so pokazali statistično značilne razlike v poškodovanosti med posameznimi kloni, kar pomeni, da je odpornost genetsko pogojena. Ugotovili so močno korelacijo med poškodovanostjo klonov in senescenco listja jeseni. Kloni, ki so bili bolj zdravi, so v povprečju jeseni prej odvrgli listje. Manj poškodovani kloni naj bi se torej izognili večjim poškodbam s tem, da so okuženo listje odvrgli, preden se je gliva uspela razširiti v poganjke in veje. Opazili so tudi, da se poškodovanost pri nekaterih klonih z leti povečuje hitreje kot pri drugih, kar je kazalo na to, da nekateri osebki po okužbi uspešneje zavirajo rast glive kot drugi. Z izvedbo inokulacij glive *C. fraxinea* v vejice različnih klonov in opazovanjem povzročenih nekroz so to kasneje tudi dokazali (McKinney in sod., 2012b). Odpornejši osebki se torej domnevno izognejo bolezni z zgodnjim odpadanjem listja ali pa z aktivnimi obrambnimi mehanizmi, ki ovirajo širjenje glive *C. fraxinea* v gostiteljskih tkivih.

Podobne raziskave so potekale tudi v Avstriji (Kirisits in Freinschlag, 2012) in na Švedskem (Stener, 2013) in tudi te so potrdile razlike v odpornosti posameznih osebkov velikega jesena. Tudi Stener (2013) je odkril korelacijo med senescenco listja jeseni in poškodovanostjo posameznih klonov. Pri tem je treba dodati, da so podobno kot na Danskem senescenco listja ocenjevali na podlagi spremembe barve listja. Če so poškodovanost posameznih klonov primerjali z deležem predčasno odpadlega listja (zaradi okužb z glivo *C. fraxinea*), so odkrili ravno obratno povezavo. Kloni, ki so bili bolj poškodovani, so namreč prej in bolj intenzivno odmetavali okuženo listje. V Avstriji jasne povezave med odpadanjem okuženega listja in intenziteto poškodb niso odkrili (Kirisits in Freinschlag, 2012). Na

Danskem so proučevali tudi povezavo med časom odganjanja listja in poškodovanostjo jesenov (Bakys in sod., 2013; McKinney in sod., 2010). Ugotovili so, da so jeseni, ki spomladi prej odženejo, na bolezen bolj odporni. To kaže na to, da je mlajše listje za okužbe dovzetnejše kot starejše. Raziskave, ki so bile narejene na istem klonskem materialu, vendar na različnih lokacijah, so pokazale, da okolje ne vpliva na odpornost, odpornost pa naj bi padala z zmanjševanjem rastnega potenciala oziroma vitalnosti dreves (McKinney in sod., 2011; Skovsgaard in sod., 2010; Stener, 2013).

Individualna odpornost posameznih osebkov velikega jesena je bila torej dokazana, nismo pa zasledili nobenih objav o raziskavah individualne odpornosti poljskega jesena (*F. angustifolia*). Kolikšno vrednost imajo te ugotovitve in kakšne so možnosti za križanje in selekcijo na odpornost, je odvisno od tega, kako se odpornost prenaša oziroma deduje s staršev na potomce (Kjær in sod., 2012). McKinney in sod. (2011) so ocenili, da dedljivost v širšem smislu znaša 0,25–0,54. V kasnejših poskusih na potomcih so na Dansku ugotovili, da je velik delež predstavlja aditivna genetska varianca, saj so dedljivost v ožjem smislu ocenili na 0,37–0,52 (Kjær in sod., 2012). Podobne vrednosti so z raziskavami dobili tudi v Litvi (Pliura in sod., 2011), kjer so dedljivost v ožjem smislu ocenili na 0,40–0,49.

2.6 OBJAVE RAZISKAV TE DOKTORSKE DISERTACIJE

Posamezni deli raziskav te doktorske disertacije so bili delno ali v celoti predstavljeni v štirih objavljenih znanstvenih prispevkih na konferencah (Hauptman, 2011, Hauptman in Jurc, 2013; Hauptman in sod., 2012a; Hauptman in sod., 2012b), v enem kratkem znanstvenem prispevku (Hauptman in sod., 2010) in v enem izvirnem znanstvenem članku (Hauptman in sod., 2013).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 VPLIV TEMPERATURE NA GLIVO *Chalara fraxinea*

3.1.1 Vpliv temperature na rast glive *Chalara fraxinea* v čisti kulturi

Izolate, ki smo jih uporabili za namene raziskav vpliva temperature na rast glive *C. fraxinea* v čisti kulturi, smo pridobili iz Zbirke Laboratorija za varstvo gozdov (ZLVG) na Gozdarskem inštitutu Slovenije (GIS). Izbrali smo štiri izolate, ki so se med seboj razlikovali po morfoloških značilnostih kultur in ki so izvirali iz geografsko različnih območij. Vsi izbrani izolati so bili izolirani iz okuženih dreves velikega jesena (*F. excelsior*). Natančne lokacije teh dreves in drugi podatki izbranih izolatov so prikazani v preglednici 1. Izbrani izolati so bili pred začetkom poskusa precepljeni na sladni agar (2 % MEA) in za tri tedne shranjeni v temi pri temperaturi 22 °C. Za lažje razumevanje v besedilu uporabljamo delovne oznake izolatov (preglednica 1).

Preglednica 1: Podatki izbranih izolatov glive *C. fraxinea*

Table 1: Information on experimental *C. fraxinea* isolates

Izolat/ <i>Isolate</i>	Lokacija vzorčenja/ <i>Sampling location</i>	Datum izolacije/ <i>Isolation</i> date	Izoliral/ <i>Isolated by</i>	Delovna oznaka/ <i>Working</i> <i>label</i>
ZLVG 176	Negova; 46°36'26" N, 15°56'06" E	06.04.2007	N. Ogris	NEG
ZLVG 177	Ribnica; 45°41'39" N, 14°46'10" E	26.07.2007	N. Ogris	RIB
ZLVG 200	Sabansko bukovje; 46°00'12" N, 15°02'30" E	01.06.2007	N. Ogris	SB
ZLVG 213	Kranj; 46°14'29" N, 14°21'29" E	01.08.2008	N. Ogris	KR

Rast izbranih izolatov glive smo spremljali na dveh različnih gojiščih, in sicer na sladnem agarju (MEA; 2 % Malt Extracta, 1,5 % agarja, Difco) in krompirjevem agarju (3,9 % PDA, Difco), v petrijevkah premera 70 mm. Koščke podgobja (premer 6 mm) z roba tri tedne starih kultur izbranih izolatov glive smo z micelijem navzdol položili na sredino petrijevk z gojišči, ki smo jih nato shranili v inkubator. Rast glive smo spremljali pri osmih različnih temperaturah (5, 10, 15, 20, 22, 25, 28 in 30 °C). Poskus smo izvedli v petih ponovitvah. Polmer kolonij glive smo merili v štirih pravokotnih smereh v razmikih dva, tri ali štiri dni (odvisno od hitrosti rasti glive pri različnih temperaturah). Hitrost rasti je bila izračunana na podlagi meritev v linearni fazni rasti kolonij (Trinci, 1969).

3.1.2 Toplotna obdelava kultur glive *Chalara fraxinea*

Izolate RIB, SB, KR in NEG, ki smo jih uporabili za namene raziskav vpliva temperatur na rast glive *C. fraxinea* v čisti kulturi, smo uporabili tudi v poskušu toplotne obdelave kultur glive. Omenjene izolate smo zato precepili na gojišča (7 ml MEA; 3 % Malt Extracta, 1,5 % agarja, Difco) v epruvetah s premerom 16 mm. Epruvete s kulturo glive so bile nato 14 dni shranjene v temi pri 22 °C. Pred začetkom obdelave smo kulture v epruvetah prekrili z 2 ml sterilne MilliQ® vode. Kulture v epruvetah smo nato v inkubatorju segreli do določene temperature (34, 36, 38, 40, 42 ali 44 °C) in jih izbrani temperaturi izpostavili za eno, dve, štiri, osem, 16 ali 24 ur. Za vsak način obdelave (izolat/temperatura/čas) smo izvedli tri ponovitve. Po obdelavi smo koščke podgobja glive iz vsake epruvete precepili v petrijevke na sveža gojišča (2 % MEA in 3,9 % PDA). Petrijevke smo nato hranili v temi pri 22 °C in jih tri tedne redno pregledovali. Če se je rast micelija iz precepljenih obdelanih koščkov podgobja pojavila, je bila kultivabilnost uspešna.

3.1.3 Toplotna obdelava sadik in okuženih poganjkov velikega jesena (*F. excelsior*) v vodi

Toplotno obdelavo sadik in poganjkov velikega jesena v vodi smo opravili aprila 2010, novembra 2010 in marca 2011. Rastlinski material smo segrevali v termično izolirani kadi (slika 9). Vodo v kadi smo segrevali s potopnim grelcem podjetja Sept (2500 W). Konstantno in homogeno temperaturo vode v kadi sta omogočala termostat Technologic K38 in potopna črpalka Neptun NSP 35. Kontrolne meritve temperature vode med različnimi načini obdelave so pokazale, da so se temperature spremajale od −0,8 °C do +0,4 °C glede na izbrane temperature.

3.1.3.1 Segrevanje okuženih sadik velikega jesena

Aprila 2010 smo z vodo toplotno obdelali triletne sadike velikega jesena (*F. excelsior*), ki so bile okužene z glivo *C. fraxinea* in so kazale že precej pozne simptome jesenovega ožiga. Sadike so izvirale iz gozdne drevesnice podjetja Semesadike d. d. v Tišini (46°39'12" N, 16°05'46" E). Sadike smo v kadi 5 ali 10 ur segrevali pri 36, 40 ali 44 °C. Po segrevanju smo sadike ohladili v hladni vodi. Za vsak način obdelave (čas/temperatura) smo uporabili 40 sadik. Polovica obdelanih sadik je bila po segrevanju razrezana na dvoje. Zgornji deli razrezanih sadik so služili za izolacije gliv v čiste kulture, spodnje (10–20 cm dolgi) dele debel s koreninami pa smo skupaj z nerazrezanimi sadikami posadili na vrtu GIS. Isti postopek smo uporabili tudi za 40 popolnoma neobdelanih sadik, ki so predstavljal kontrolo. Preživetje sadik smo preverjali konec maja 2010.

Ker je bila uspešnost izolacije glive *C. fraxinea* v prvem poskusu segrevanja jesenovih sadik zelo slaba celo iz kontrolnih sadik (čeprav so sadike kazale tipične simptome jesenovega ožiga), smo se odločili, da poskus ponovimo in nekoliko spremenimo metode dela.



Slika 9: Kad, v kateri smo v vodi toplotno obdelali sadike in poganjke velikega jesena

Figure 9: Bathtub, used for water heat treatments of *F. excelsior* saplings and shoots

3.1.3.2 Segrevanje vizualno zdravih jesenovih sadik in okuženih poganjkov velikega jesena

Novembra 2010 in marca 2011 smo poskus segrevanja v vodi ponovili. Tokrat smo uporabili triletne vizualno zdrave sadike velikega jesena (*F. excelsior*) ter okužene poganjke velikega jesena (*F. excelsior*), ki so kazali sveže okužbe z glivo *C. fraxinea*. Sadike smo dobili v gozdni drevesnici Omorika na Muti ($46^{\circ}35'59''$ N, $15^{\circ}09'25''$ E), okužene poganjke pa smo nabrali v močno okuženem sestoju velikega jesena, na vzpetini vzhodno od mesta Kamnik ($46^{\circ}13'10''$ E, $14^{\circ}37'44''$ N). Načini obdelave (čas/temperatura) so bili enaki kot v poskusu, ki smo ga izvedli aprila 2010. Za vsak način obdelave smo uporabili 20 sadik in 20 okuženih poganjkov. Sadike smo po segrevanju posadili na vrtu GIS, okužene poganjke pa smo uporabili za izolacije gliv v čiste kulture. Za kontrolo poskusa smo na vrtu GIS poleg obdelanih sadik posadili tudi 20 popolnoma neobdelanih sadik, prav tako pa smo izolacije gliv v čiste kulture opravili iz 20 neobdelanih okuženih poganjkov. Preživetje sadik smo preverjali maja in junija 2011.

3.1.3.3 Izolacije gliv v čiste kulture in morfološka karakterizacija izolatov

Glive smo iz okuženih poganjkov oziroma sadik izolirali iz obarvanega nekrotičnega lesa. Koščke lesa smo izrezali iz robov nekroz oziroma iz predelov med okuženim in zdravim lesnim tkivom. Iz vsakega poganjka oziroma sadike smo izrezali osem koščkov. Izrezane koščke smo nato površinsko dezinficirali, in sicer tako, da smo jih za 5 sekund potopili v razredčeno komercialno belilo (50 % Arekine - NaOCl, 50 % destilirane vode), ki je vsebovalo 3 % aktivnega klora. Preden smo koščke lesa prenesli na gojišča v petrijevke (štiri/petrijevko; 2% MEA), smo jih položili na sterilni filtrirni papir, ki je vpil odvečno tekočino. Petrijevke smo shranili v temi pri 22 °C in jih naslednjih pet tednov redno pregledovali. V primeru pojava rasti micelija katere koli glive, smo tega precepili na sveže gojišče v novo petrijevko. Vse domnevne izolate glive *C. fraxinea* smo nato prenesli v hladilnik, kjer smo jih hranili pri temperaturi 5 °C. Formiranje značilnih fialid s konidiji je potrdilo uspešno izolacijo glive *C. fraxinea*. Vse ostale izolirane kulture, ki so se morfološko razlikovale od glive *C. fraxinea*, smo s pomočjo lupe (Olympus SZX 12) vizualno pregledali in jih na podlagi barve, strukture in hitrosti rasti razporedili v različne morfotipe. Za vsak morfotip in tudi za glivo *C. fraxinea* smo izračunali uspešnost izolacije za vsak način obdelave. Prešteli smo število sadik oziroma poganjkov, iz katerih smo uspešno izolirali določen morfotip oziroma glivo *C. fraxinea*, in to število primerjali s številom vseh sadik oziroma poganjkov, ki so služili za izolacijo (20/način obdelave). Po en predstavnik vsakega morfotipa je bil izbran za nadaljnjo molekularno determinacijo, shranili pa smo jih tudi v Zbirko laboratorija za varstvo gozdov GIS (preglednica 6).

3.1.3.4 Molekularna determinacija izoliranih morfotipov

Genomsko DNA gliv smo ekstrahirali iz micelija, ki smo ga postrgali iz 1 cm² površine gojišča. Ekstrakcijo genomske DNA smo izvedli po protokolu, ki so ga opisali Piškur in sod. (2007) in z uporabo komercialnih kitov za ekstrakcijo genomske DNA PrepMan® Ultra Sample Preparation (Applied Biosystems) ali NucleoSpin Plant II kit (Macherey Nagel). Koncentracijo ekstrahirane DNA smo izmerili s spektrometrom BioPhotometer (Eppendorf).

Z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) smo pomnoževali odsek DNA v genomu gliv, ki zajema regijo 18S rRNA (delno), ITS1, 5,8S rDNA, ITS2 in 28S rRNA (delno). Za pomnoževanje smo uporabili glivna univerzalna začetna oligonukleotida ITS1 in ITS4. 25-mikrolitrska reakcijska mešanica za izvedbo PCR je vsebovala 12,5 µl pufra PCR 2X PCR Master Mix (Fermentas), 0,5 µl vsakega od 10 µM začetnih oligonukleotidov (Sigma Aldrich), 1,2 µl ekstrahirane DNA s približno koncentracijo 100 µg/ml in 10 µl vode, ki ne vsebuje nukleaz (Fermentas). Za pomnoževanje smo uporabili naslednji program: začetni 3-minutni denaturacijski pri 95 °C je sledilo 39 ciklov denaturacije pri 95 °C (30 s), prileganja

pri 55 °C (45 s) in podaljševanja pri 72 °C (90 s), postopek pa se je končal z 10-minutnim podaljševanjem pri 72 °C.

Za preverjanje učinkovitosti izolacije DNA ter za odkrivanje in ločevanje produktov PCR smo uporabili horizontalno agarozno gelsko elektroforezo. Gele smo pripravili iz 1-odstotne (w/v) raztopine agaroze (Sigma Aldrich) v pufru 1 × Tris-acetat EDTA (TAE) z dodatkom etidijevega bromida do končne koncentracije 5×10^{-4} µg/ml. Elektroforeza je potekala v pufru 1 × TAE pri konstantni napetosti 90 V. Po končani elektroforezi smo DNA vizualizirali na UV-transiluminacijskem sistemu za zajem slike (MiniBisPro, DNR BioImaging Systems).

Za namen sekvenciranja smo pomnoženo regijo DNA očistili s kompletom za čiščenje produktov PCR Wizard SV gel in PCR Clean-Up sistem (Promega). Sekvenciranje obeh verig DNA je bilo izvedeno v podjetju Macrogen na Nizozemskem z enakima začetnima oligonukleotidoma, ki sta bila uporabljena tudi v reakcijah PCR. Sekvence smo ročno analizirali s programom Chromas Lite Version 2.01 (Technlysim Pty Ltd) in BioEdit. Vse nejasne nukleotidne pozicije so bile razjasnjene s primerjavo sekvenc obeh verig pomnožene regije DNA. Sekvence smo poravnali s programom MAFFT (dostop prek <http://align.genome.jp/mafft>). Urejene sekvence smo primerjali z bazo podatkov »nr/nt« za BLAST s programom BLASTN (dostop prek www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.1.4 Spremljanje temperatur na sadikah velikega jesena (*F. excelsior*)

Spremljanje temperatur je potekalo na štirih sadikah velikega jesena (*F. excelsior*), ki so bile posajene na vrtu GIS (46°03'05" N, 14°28'59" E). Temperature so bile izmerjene in shranjene vsakih 15 minut. Za izdelavo temperaturnih senzorjev je bil uporabljen NTC upor (Panasonic) 10k Ohm v 0402-ohišju. Temperaturni senzorji so bili priklopljeni na hranilnik podatkov z 12 kanali, ki je bil izdelan v Laboratoriju za elektronske sisteme na GIS. Meritve smo začeli 6. julija in končali 15. septembra leta 2011. Vsako sadiko smo opremili s tremi temperaturnimi senzorji (slika 10). Prvi je bil pritrjen na višini 75 cm in je meril temperaturo zraka ob sadiki, drugi je bil prilepljen na debelce sadike na višini 65 cm in je meril temperaturo skorje, tretji pa je bil vstavljen v 2 mm široko luknjico, ki smo jo izvrtili na višini 60 cm, in je meril temperaturo lesa v sredini sadike. Sadike so bile na mestih vrtanja luknjic debele 11 do 12 mm. Vse štiri s temperaturnimi senzorji opremljene sadike so rasle znotraj 1 m². Na isti gredici so rasle še druge jesenove sadike, ki so bile iste starosti in podobne višine. Gredica, kjer so rasle sadike, je bila izpostavljena soncu, tako, da so bile izbrane sadike v času merjenja le občasno in le delno zasenčene s sosednjimi sadikami.



Slika 10: Sadika velikega jesena, opremljena s temperaturnimi senzorji

Figure 10: *F. excelsior* sapling, equipped with temperature sensors

3.1.5 Analize podatkov raziskav vpliva temperature na glivo *C. fraxinea*

Vpliv temperature na rast glive v čisti kulti smo analizirali z uporabo splošnega linearnega modela z normalno porazdelitvijo (McCullagh in Nelder, 1989). Variance med skupinami znotraj dejavnikov izolat in temperatura niso bile enake, zato smo za oba dejavnika uporabili strukturo variance. Izbor modela smo opravili z informacijskimi kriteriji Akaike (Burnham in Anderson, 2002). Interakcije med dejavniki smo analizirali z Games-Howellovim testom. Vpliv temperature na kultivabilnost kultur glive *C. fraxinea* po segrevanjih smo analizirali s splošnim linearnim modelom z Laplaceovim približkom in binominalno porazdelitvijo (McCullagh in Nelder, 1989). Izolate smo obravnavali kot naključni dejavnik. Model smo izbrali z informacijskimi kriteriji Akaike (Burnham in Anderson, 2002). Razlike v preživetju toplotno obdelanih sadik smo proučevali z binominalnim Ryanovim testom. Vse analize so bile narejene s statističnim programom R (R Development Core Team, 2011) in programom Excel®.

3.2 VPLIV IZBRANIH FUNGICIDOV IN UREE NA GLIVO *Chalara fraxinea*

Za namene raziskav vpliva različnih fungicidov in uree na rast glice *C. fraxinea* v čisti kulturi smo uporabili iste izolate, ki smo jih uporabili tudi v raziskavah vpliva temperatur na glivo *C. fraxinea* (preglednica 1).

3.2.1 Vpliv izbranih fungicidov in uree na rast glice v čisti kulturi

V tej raziskavi smo uporabili fungicide, ki se v praksi uporabljamjo za zatiranje nekaterih gliv, ki prav tako kot gliva *C. fraxinea* pripadajo redu Helotiales. V preliminarni test smo vključili osem fungicidov. Koncentracije, ki smo jih uporabili, smo dobili s pretvorbo predlaganih koncentracij za uporabo posameznega sredstva v praksi, pri čemer je kot pretvorbeni faktor služila površina (iz hektarjev obdelovalnih površin na površino petrijevk). Podatki testiranih fitofarmacevtskih sredstev in koncentracija, ki smo jo uporabili v preliminarnem testu, so prikazani v preglednici 2. Pet fungicidov, ki so se v preliminarnih testih izkazali za učinkovitejše, smo izbrali za nadaljnje teste.

Preglednica 2: Podatki o fungicidih, ki smo jih uporabili v preliminarnem testu

Table 2: Data on fungicides used in preliminary test

Fungicid/Fungicide	Aktivna snov/ Active ingredient	Delež (%)/ Share (%)	Proizvajalec/ Producer	Koncentracija*/ Concentration *
BAVISTIN FL	Karbendazim	50 w/v	BASF SE	12 µl/l
BRAVO 500 SC	Klorotalonil	51,5 w/v	SYNGENTA	69 µl/l
MERPAN 80 WDG	Kaptan	80 w/w	MEKHTESHIM- AGAN	69 mg/l
MYTHOS	Pirimetanil	30 w/v	BASF SE	58 µl/l
ROVRAL AQUAFLO	Iprodion	50 w/v	BASF SE	52 µl/l
OCTAVE	Prokloraz	50 w/w	BASF SE	9 mg/l
TELDOR SC 500	Fenheksamid	50 w/v	BAYER SC	35 µl/l
THIRAM 80 WG	Tiram	80 w/w	TAMINCO	69 mg/l

* µl oziroma mg sredstva na liter gojišča PDA / µl or mg of fungicide per litre of PDA growth media

Za vse testirane fungicide smo najprej pripravili 100 ml oziroma 1000 ml založne raztopine. To smo naredili tako, da smo v sterilno destilirano vodo dodali 1 ml oziroma 1 g posameznega fitofarmacevtskega sredstva. Z nadaljnjjim redčenjem založne raztopine smo pripravili 10-mililitrske raztopine, ki so vsebovale izbrane količine aktivnih snovi. Tako pripravljeni raztopini smo nato dodali 490 ml krompirjevega agarja (3,9 % PDA, Difco), ki je imel v trenutku dodajanja približno 50 °C. V nasprotju s preliminarnim testom smo v nadaljevanju raziskav vseh pet izbranih fungicidov testirali pri istih koncentracijah, in sicer pri 10, 1 in 0,1 mg aktivne snovi na liter gojišča PDA. Na podoben način smo pripravili tudi gojišča z dodatkom uree, le da smo 1000 ml založne raztopine pripravili iz 10 g uree (UREA

for analysis – CARLO ERBA) in sterilne destilirane vode. Z redčenjem smo nato pripravili 10 ml raztopine z različno vsebnostjo uree, ki smo jo primešali 490 ml krompirjevega agarja (50 °C). Tako smo pripravili gojišča s koncentracijami 0,5; 1; 2,5; 5 in 10 g uree na liter gojišča. Kontrolna gojišča smo pripravili tako, da smo 490 ml krompirjevega agarja dodali 10 ml sterilne destilirane vode.

Petrijevke s pripravljenimi gojišči smo inokulirali s koščki agarja s podgobjem glive *C. fraxinea* (premer 6 mm), ki smo jih izrezali iz roba tri tedne starih kultur. Koščke smo z micelijem navzdol položili na sredino petrijevk, ki smo jih nato shranili v inkubator pri 22 °C. Poskus smo izvedli v petih ponovitvah. Rast smo redno spremljali, končne meritve pa smo opravili, ko so bile v celoti preraščene petrijevke, v katerih so izolati rasli najhitreje. Po 14 dneh smo vsem kolonijam v dveh pravokotnih smereh izmerili premer in izračunali povprečno vrednost. Izmerjenim premerom smo odsteli 6 mm, kolikor so merili koščki, s katerimi smo inokulirali gojišča v petrijevkah. Za boljše razumevanje učinkovitosti posameznih kemičnih sredstev so rezultati predstavljeni kot relativne vrednosti glede na rast glive na kontrolnih gojiščih.

3.2.2 Vpliv izbranih fungicidov in uree na oblikovanje apotecijev glive *H. pseudoalbidus*

Listne peclje velikega jesena (*F. excelsior*), ki smo jih uporabili v tem testu, smo nabrali 25. novembra 2010 v Ljubljani (46°03'11" N, 14°29'15" E) in jih do 15. januarja 2011 hranili v hladilniku pri 6 °C. Tako kot v poskusih vpliva fungicidov na rast glive v čisti kulturi smo tudi v tej raziskavi iz založne raztopine z redčenjem pripravili 10-mililitrske raztopine, ki smo jih nato primešali 490 ml sterilne destilirane vode. Tako smo pripravili 500-mililitrske raztopine, ki so vsebovale različne količine aktivnih snovi. Fungicida Bavistin in Octave smo testirali pri koncentracijah 0,01; 0,1; 1 in 10 mg aktivne snovi na liter raztopine, sredstva Bravo, Merpan in Thiram pa pri koncentracijah 0,1; 1; 10 in 100 mg aktivne snovi na liter raztopine. Pripravljene raztopine smo prelili v steklene petrijevke s premerom 22 cm, v katere smo prej položili nabrane jesenove peclje (25 na petrijevko). Peclje smo nato obtežili, tako da so bili vsi v celoti potopljeni v raztopini. Kontrolne peclje smo potopili v 500 ml sterilne destilirane vode. Po 24 urah smo peclje vzeli iz raztopin oziroma vode, jih nato 4 ure sušili na zraku in jih nato položili na vlažne papirnate brisače v druge petrijevke. Peclje smo tako hranili več tednov in vsak teden smo v petrijevkah nadomestili vlažne papirnate brisače z novimi ter spremljali razvoj apotecijev glive. Temperature prostora, v katerem so bile shranjene petrijevke s peclji, so se gibale med 17 in 23 °C. Po dobrem mesecu dni (18. februarja 2011) smo vse peclje natančno pregledali in prešteli število razvitih apotecijev glive. Peclje z razvitimi apoteciji smo slikali z uporabo lupe Olympus SZX 12 in kamere Nikon, ki sta povezani z računalniškim programom NIS-Elements BR 2.30. S tem programom smo tudi izmerili površino trosovnic.

Spomladi leta 2011 smo jesenove peclje obdelali z različnimi koncentracijami uree (0,5; 1; 2,5; 5 in 10 g uree na liter raztopine). Peclje za ta poskus smo nabrali 20. aprila, in sicer na isti lokaciji kot za poskus s fungicidi. Do 28. aprila smo jih hranili v hladilniku pri 6 °C. Peclje smo tudi v tem primeru položili v steklene petrijevke (22 cm) in jih prelimi z raztopinami z različnimi koncentracijami uree oziroma s sterilno destilirano vodo v primeru kontrol. Tudi v tem poskusu smo peclje po obdelavi najprej posušili na zraku, nato pa jih shranili v steklene petrijevke na vlažne papirnate brisače. Temperature prostora, v katerem smo hranili petrijevke s peclji, so se sprva gibale med 23 in 25 °C. Ker so se apoteciji slabo razvijali, smo po 35 dneh petrijevke prenesli v klimatiziran laboratorij, kjer je bila stalna temperatura 21 °C. Da bi preverili vpliv temperature na razvoj apotecijev, smo eno petrijevko s kontrolnimi peclji pustili v prostoru s temperaturami med 23 in 25 °C. Peclje smo ves čas pregledovali, 13. junija pa smo naredili končni popis števila apotecijev na pecljih.

3.2.3 Analiza podatkov raziskav vpliva fungicidov in uree na glivo *C. fraxinea*

Vpliv različnih aktivnih snovi, koncentracij in izolatov na rast kolonij glive *C. fraxinea* ter interakcije med omenjenimi dejavniki smo testirali z linearnim mešanim modelom, opremljenim z REML in s strukturo variance za dejavnik koncentracija (Zuur in sod., 2009). Koncentracijo smo uporabili kot slučajni dejavnik. Za testiranje vpliva različnih aktivnih snovi in različnih koncentracij teh snovi na oblikovanje apotecijev ter interakcije med tem dejavnikoma smo uporabili linearni model, opremljen z REML in strukturo variance za oba omenjena dejavnika. Enak model, tokrat s strukturo variance za dejavnika koncentracija uree in izolat, smo uporabili za testiranje vpliva različnih koncentracij uree in različnih izolatov glive ter za testiranje medsebojnih interakcij med omenjenima dejavnikoma na rast glive *C. fraxinea*.

Po vseh zgoraj opisanih testih smo za testiranje razlik med manjšimi skupinami po različnih dejavnikih uporabili Games-Hawellov post hoc test (Quinn in Keough, 2002).

Vpliv različnih koncentracij uree na oblikovanje apotecijev smo analizirali s Kruskal Wallisovim testom (Quinn in Keough, 2002), ki mu je sledil neparametrični post hoc test mnogoterih primerjav (Siegel in Castellan, 1988).

Vse analize so bile narejene s statističnim programom R (R Development Core Team, 2011).

3.3 INTERAKCIJE MED GLIVO *C. fraxinea* IN DRUGIMI GLIVAMI, KI SMO JIH IZOLIRALI IZ JESENOVIH TKIV

Interakcije med glivo *C. fraxinea* in drugimi glivami, ki smo jih izolirali iz jesenovih tkiv, smo opazovali na gojiščih t. i. dvojnih kultur. Te smo pripravili tako, da smo 1. 2. 2013 v petrijevke s premerom 90 mm na sladni agar (2% MEA) najprej položili po en 6-milimetrski košček agarja z micelijem glive *C. fraxinea*. Tri dni kasneje smo 50 mm stran položili košček agarja z micelijem določene druge glive. Glivo *C. fraxinea* smo tako v treh ponovitvah gojili skupaj z 19 drugimi glivami (preglednica 3). Te glive smo pridobili v poskusu segrevanja sadik in poganjkov vrste *F. excelsior* (glej poglavja 3.1.3 in 4.1.3) in z reisolacijami gliv po inokulaciji klonov vrste *F. angustifolia* z glivo *C. fraxinea* (glej poglavja 3.4.4 in 3.4.6).

Preglednica 3: Glive, ki smo jih v dvojnih kulturah gojili skupaj z glivo *C. fraxinea*

Table 3: Fungi, which grew together with *C. fraxinea* in dual cultures

Izolat/Izolate	Gliva/Fungus	Lokacija/ Location	Drevesna vrsta/ Tree species
ZLVG 318	<i>Phomopsis</i> sp. 1	Tišina	<i>F. excelsior</i>
ZLVG 319	<i>Leptospora rubella</i>	Tišina	<i>F. excelsior</i>
ZLVG 320	<i>Epicoccum nigrum</i>	Tišina	<i>F. excelsior</i>
ZLVG 321	<i>Leptosphaeria</i> sp.	Tišina	<i>F. excelsior</i>
ZLVG 322	<i>Lophiostoma corticola</i>	Tišina	<i>F. excelsior</i>
ZLVG 323	<i>Diaporthe viticola</i>	Tišina	<i>F. excelsior</i>
ZLVG 324	<i>Bjerkandera adusta</i>	Tišina	<i>F. excelsior</i>
ZLVG 325	<i>Phomopsis</i> sp. 2	Tišina	<i>F. excelsior</i>
ZLVG 326	<i>Alternaria alternata</i>	Tišina	<i>F. excelsior</i>
ZLVG 328	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Tišina	<i>F. excelsior</i>
ZLVG 329	<i>Phoma</i> sp.	Tišina	<i>F. excelsior</i>
ZLVG 336	<i>Cadophora luteo olivacea</i>	Tišina	<i>F. excelsior</i>
ZLVG 337	<i>Hypoxyylon howeanum</i>	Kamnik	<i>F. excelsior</i>
ZLVG 338	<i>Biscogniauxia nummularia</i>	Kamnik	<i>F. excelsior</i>
ZLVG 366	<i>Coniochaeta</i> sp.	Hraščica	<i>F. angustifolia</i>
ZLVG 367	<i>Fusarium</i> sp.	Hraščica	<i>F. angustifolia</i>
ZLVG 370	<i>Hyalodendriella</i> sp.	Hraščica	<i>F. angustifolia</i>
ZLVG 371	<i>Hypocrea</i> sp.	Hraščica	<i>F. angustifolia</i>
ZLVG 372	<i>Phaeoacreminum</i> sp.	Hraščica	<i>F. angustifolia</i>

Rast gliv v petrijevkah smo nato tri tedne redno spremljali, pozorni pa smo bili predvsem na interakcije v času, ko sta se koloniji gliv približali druga drugi. Po treh tednih in kasneje po treh mesecih smo naredili popis stanja v posamezni petrijevki. Petrijevke smo ves čas hranili v temi pri temperaturi 21 °C. Da bi preverili, ali so se v določenih primerih glive začele preraščati, smo koščke z micelijem iz različnih lokacij v petrijevkah precepili na svež agar.

3.4 INDIVIDUALNA ODPORNOST POLJSKEGA JESENA (*Fraxinus angustifolia*)

3.4.1 Klonski nasad poljskega jesena v Hraščici

Delo na terenu smo opravili v klonskem nasadu poljskega jesena (*F. angustifolia*) v Hraščici (46°38'45" N, 16°16'04" E). Nasad je bil zasnovan leta 1989 iz cepljenk 40 različnih klonov. Cepiči so bili pridobljeni iz plus dreves lokalne provenience. V začetku je bilo posajenih 508 cepljenk, leta 2009, ko smo opravili prvi popis poškodovanosti, pa jih je bilo v nasadu prisotnih še 467. Kloni so se razlikovali po številu osebkov (1 do 24). Ob prvem popisu smo ugotovili, da vsi kloni ne pripadajo vrsti *F. angustifolia*. To so pokazale tudi molekularne analize klonov (Westergren in sod., 2013), ki so jih izvedli na Oddelku za gozdno fiziologijo in genetiko (GIS), zato teh klonov pri analizi rezultatov nismo upoštevali. Iz analize smo izpustili tudi klone z manj kot desetimi osebki. Treba je še omeniti, da je nasad že več kot deset let prepuščen naravnemu razvoju. V tem času so se v nasadu močno razrasle razne pionirske vrste in zaradi tega so krošnje številnih dreves že precej utesnjene. Prvi simptomi jesenovega ožiga v Sloveniji so bili jeseni 2006 odkriti le nekaj deset kilometrov od Hraščice (Ogris in sod., 2009a) zato sklepamo, da je bolezen v nasadu prisotna vsaj od leta 2007.

3.4.2 Popisi poškodovanosti krošenj

Popise poškodovanosti krošenj posameznih klonov v klonskem nasadu v Hraščici smo izvedli 23. julija 2009, 5. avgusta 2010, 22. julija 2011 in 19. julija 2012. Dva raziskovalca (T. Hauptman in N. Ogris) sta vsako krošnjo pregledala z več mest okoli drevesa in poškodovanost krošnje ocenila na 5 % natančno. Ista raziskovalca sta opravila vse štiri popise poškodovanosti. Ker je bilo v vsem nasadu opaziti mnogo tipičnih simptomov jesenovega ožiga, smo predpostavili, da so poškodbe krošenj rezultat okužb z glivo *C. fraxinea*. Kljub vsemu pa smo zapisali tudi vse znake oziroma simptome, ki so kazali na delovanje drugih škodljivih dejavnikov. V ocenjevanje pa nismo vključili spodnjih vej krošenj, saj te zelo pogosto odmrejo zaradi zasenčenosti.

3.4.3 Inokulacije glive *C. fraxinea* v veje izbranih klonov

Na podlagi prvega popisa poškodovanosti krošenj v letu 2009 smo za poskus inokulacije izbrali tri klone, in sicer v povprečju najbolj poškodovan klon (št. 26), predstavnika povprečno poškodovanih klonov (št. 24) in klon, katerega krošnje so bile najmanj poškodovane (št. 10). Za inokulacije smo uporabili izolata RIB in NEG (preglednica 1), ki smo ju v ta namen štiri tedne pred poskusom precepili na sladni agar (MEA; 2 % Malt Extract, 1,5 % agar, Difco).

Veje izbranih klonov smo inokulirali 2. septembra 2010. Za inokulacijo z glivo *C. fraxinea* smo izbrali 40 (20 za vsak izolat glive) nepoškodovanih vej izbranih klonov. Z luhnjačem za pluto (premer 8 mm) smo odstranili delček skorje. Na mesto, kjer smo odstranili skorjo, smo nato položili koščke gojišča s podgobjem (premer 8 mm) glive *C. fraxinea*. Koščke smo obrnili tako, da je micelij glive prišel v stik s kambijem gostitelja. Mesta inokulacije smo nato povili s Parafilmom in aluminijasto folijo. Dodatno smo za kontrolo s podobnim postopkom inokulirali še pet vej vsakega izbranega klena, le da smo za inokulum uporabili sterilne koščke sladnega agarja (2% MEA). Debelina izbranih vejc na mestih inokulacije je bila 8–12 mm.

Dva meseca po inokulacijah (2. november 2010) smo vse inokulirane veje odrezali in prepeljali v Laboratorij za varstvo gozdov GIS. Naslednji dan smo izmerili dolžine nekroz, ki jih je povzročila gliva. Izmerili smo tako dolžine nekroz v skorji kot tudi v lesu. Da bi potrdili, da je nekroze res povzročila gliva *C. fraxinea*, smo opravili reisolacije gliv v čiste kulture. V ta namen smo za vsako kombinacijo klen/izolat naključnostno izbrali pet inokuliranih vej. Za kontrolo smo reisolacije naredili tudi iz šestih (2 veji na izbran klen) naključnostno izbranih vej, ki so bile inokulirane s sterilnim agarjem. Postopek reisolacije in determinacije je bil enak postopku, ki je opisan v poglavijih 3.1.3.3 in 3.1.3.4.

3.4.4 Popisi odpadlega listja ter razvitosti brstov

Da bi preverili, če je poškodovanost krošenj odvisna od fenologije klonov smo opravili popise odpadanja listja in spomladanske razvitosti brstov.

Stopnjo (predčasnega) odpadanja listja smo ocenjevali 22. avgusta, 1. septembra in 12. oktobra leta 2011. Vsako drevo smo ocenili z vrednostmi od 1 do 5, pri čemer smo z 1 ocenili jesene, ki niso kazali simptomov odpadanja listja, s 5 pa osebke z zelo intenzivnim odpadanjem listja oziroma drevesa, ki so bila že popolnoma brez listja. Pri oceni odpadanja listja smo upoštevali oceno poškodovanosti krošnje, znake sušenja in obarvanja listja ter količino odpadlega listja pod posameznim drevesom. Drevesa z močno poškodovanimi krošnjami niso bila vključena v ocenjevanje.

Spomladi, 26. aprila 2012, smo ocenjevali razvitost brstov posameznih dreves, ki smo jih razdelili v tri razrede. V prvi razred smo uvrstili drevesa, ki so imela še popolnoma zaprte brste. V drugi razred smo uvrstili osebke z odpirajočimi se brsti in vidnimi prvimi razvijajočimi listi. V tretji razred pa smo uvrstili jesene, katerih brsti so bili že popolnoma odprtih, listi oziroma novi poganjki pa skupaj dolgi vsaj 2 do 3 cm.

3.4.5 Pregled koreničnikov izbranih klonov

Drevesa klonov, ki smo jih izbrali že za namene poskusa inokulacije glive *C. fraxinea*, smo 26. aprila 2012 pregledali tudi zaradi morebitnih okužb z glivami iz rodu *Armillaria*. Natančneje smo pregledali predvsem koreničnike izbranih klonov, pozorni pa smo bili predvsem na kakršne koli deformacije skorje. Da bi potrdili okužbo z *Armillaria* spp., smo na deformiranih mestih odstranili skorjo. Odkritje značilnih micelijskih pahljač ali pa rizomorfov je pomenilo potrditev okužbe. Da bi določili tudi vrsto mraznice, ki se pojavlja na poljskih jesenih v Hraščici, smo odvzeli nekaj vzorcev okuženega lesa, preraščenega z micelijem glive, v primeru najdbe rizomorfov glive pa smo odvzeli tudi te. Vzorce pa smo odvzeli tudi v primerih najdbe nekroz, ki niso kazale tipičnih znakov okužbe z *Armillaria* spp.

3.4.6 Izolacije gliv iz odvzetih vzorcev okuženih koreničnikov in molekularna determinacija gliv iz rodu *Armillaria*.

Iz vzorcev lesa, ki so bili preraščeni z micelijem glive, smo izrezali koščke, ki so merili približno 4×4 mm in jih nato za 2 minuti potopili v razredčeno komercialno belilo (50 % Arekine - NaOCl, 50 % destilirane vode), ki je vsebovalo 3 % aktivnega klora. Koščke smo potem položili na sterilni filtrirni papir, ki je vpil odvečno tekočino, nato pa smo jih položili v petrijevke na sladni agar z dodatkom streptomycin sulfata (MEA+S; 2 % Malt Extract, 1,5 % agar, Difco; 0,01 % streptomycin sulfat, Calbiochem). Izolacije gliv iz vzorcev, ki niso kazali tipičnih simptomov okužbe z mraznicami, smo naredili po podobnem postopku, le da so bili koščki lesa nekoliko manjši (2×2 mm), čas površinske sterilizacije pa krajiši (5 sekund). Petrijevke smo shranili v inkubator pri 22°C . Kolonije gliv, ki so kazale značilnosti gliv *Armillaria* spp. (predvsem oblikovanje rizomorfov) ali *C. fraxinea*, so bile precepljene v nove petrijevke s sladnim agarjem (2% MEA). Tako pridobljeni izolati so bili kasneje uporabljeni v postopku molekularne determinacije, ki je opisan v poglavju 3.1.3.4. Pri tem je potrebno dodati, da smo genomsko DNA gliv *Armillaria* spp. ekstrahirali tudi direktno iz micelijskih pahljačic in rizomorfov, ki smo jih odvzeli v plantaži.

Pri mraznicah smo za filogenetsko analizo nukleotidnega zaporedja dela regije ITS rDNA v poravnavo vključili nukleotidna zaporedja, pridobljena iz izolatov oziroma glivnih tkiv (micelijske pahljače in rizomorfi), in zaporedja izbranih vrst iz rodu *Armillaria*, ki smo jih pridobili iz baze podatkov GenBank (NCBI). Nukleotidna zaporedja smo poravnali s programom ClustalW (vključen v programske paket MEGA5) in iz poravnanih zaporedij izračunali filogenetsko drevo (Tamura in sod. 2011). Genetske razdalje smo izračunali po modelu Maximum Composite Likelihood (Tamura in sod., 2004) in z distančno metodo združevanja najbližjega soseda (»neighbour joining«) izrisali drevo (Saitou in Nei, 1987).

3.4.7 Analize rezultatov

Rezultati popisa poškodovanosti krošenj so bili analizirani z mešanim linearnim modelom (Zuur in sod., 2009). Posamezni osebki so bili vključeni kot slučajni dejavnik. Ker variance med različnimi skupinami niso bile homogene, smo za dejavnika klon in leto uporabili strukturo variance. Razlike med kloni po letih smo preverili z Games-Hawellovim testom (Quinn in Keough, 2002).

Tudi vpliv klonov na dolžine nekroz smo analizirali z mešanim linearnim modelom (Zuur in sod., 2009), pri čemer smo posamezne veje obravnavali kot slučajni dejavnik.

Podatke vsakega popisa odpadanja listja smo analizirali s Kruskal Wallisovim testom (Quinn in Keough, 2002), ki mu je sledil neparametrični post hoc test mnogoterih primerjav (Siegel in Castellan, 1988). Relacija med poškodovanostjo krošnje in predčasnim odpadanjem listja v posameznih obdobjih (trije popisi predčasnega odpadanja listja) je bila proučevana s Spearmanovim testom korelacije rangov.

Vse analize so bile narejene s statističnim programom R (R Development Core Team, 2011).

3.5 POŠKODOVANOST JESENOV V JESENOVIH SEMENSKIH OBJEKTIH

3.5.1 Izbor lokacij in postavitev raziskovalnih ploskev

V letu 2011 smo za namene spremeljanja jesenovega ožiga, ocene poškodovanosti jesenovih sestojev in določitve drugih škodljivih dejavnikov, ki sodelujejo v procesu propadanja jesenov v Sloveniji, postavili stalne raziskovalne ploskve. Zaradi domneve o individualni odpornosti posameznih jesenov in dejstva, da bomo za ohranitev jesena v naših gozdovih potrebovali sadike oziroma potomce dreves, ki kažejo odpornost na jesenov ožig, smo za postavitev raziskovalnih ploskev izbrali jesenove semenske objekte. Izbrali smo devet lokacij, in sicer tako, da so raziskovalne ploskve enakomerno razporejene po Sloveniji (preglednica 4, slika 11). Na dveh lokacijah je prevladujoča vrsta jesena poljski jesen (*F. angustifolia*), na sedmih pa veliki jesen (*F. excelsior*). Postavitev raziskovalnih ploskev in prvi popis poškodovanosti smo izvedli avgusta 2011 (preglednica 4).

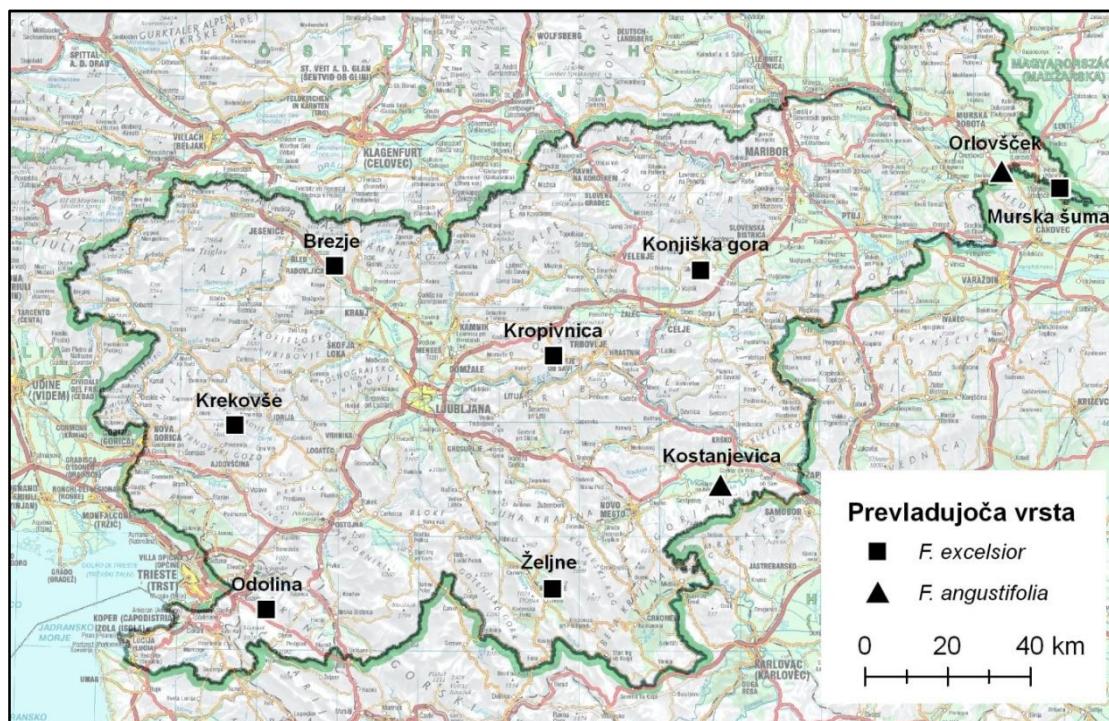
Na vsaki lokaciji smo postavili pet trajnih raziskovalnih ploskev. Prostorska razporeditev ploskev je bila vezana na oglišča vzorčne mreže 25×25 m oziroma 50×50 m, kjer je bil semenski objekt večje površine. Oglišča zarisane vzorčne mreže so predstavljala središča potencialnih ploskev. Na vsaki lokaciji je bila prva ploskev izbrana naključno in je predstavljala izhodišče za izbiro vseh nadalnjih ploskev. Izbiro vsake nadaljnje ploske na mreži je določala omejitev, da je šesto najbližje jesenovo drevo (debelejše od 10 cm) od

središča ploskve oddaljeno manj kot 30 m. Dodatna omejitev je bila, da nobeno drevo ne more biti izbrano dvakrat. Zaradi opisanega načina izbire ploskev na nekaterih lokacijah ni bilo mogoče postaviti vseh petih raziskovalnih ploskev na okviru semenskega objekta, tako da smo v teh primerih nekaj ploskev postavili v neposredni bližini objektov. Središča vseh izbranih ploskev smo trajno označili s kovinskimi palicami, ki smo jih zabili v tla.

Preglednica 4: Podatki o izbranih jesenovih semenskih objektih in datumi popisov

Table 4: Data on selected ash seed collecting stands and dates of assessments

Lokacija/ Location	Koordinate/ Coordinates	Prevladujoča vrsta jesena/ Dominant ash species	Datum popisa/ Date of assessment
Brezje	46°20'22" N, 14°13'30" E	<i>F. excelsior</i>	11.08.2011
Konjiška gora	46°19'50" N, 15°22'40" E	<i>F. excelsior</i>	25.08.2011
Kostanjevica	45°51'45" N, 15°26'06" E	<i>F. angustifolia</i>	18.08.2011
Krekovše	45°59'21" N, 13°55'05" E	<i>F. excelsior</i>	30.08.2011
Kropivnica	46°08'42" N, 14°54'51" E	<i>F. excelsior</i>	08.08.2011
Murska šuma	46°30'01" N, 16°30'45" E	<i>F. excelsior</i>	23.08.2011
Odolina	45°35'15" N, 14°01'21" E	<i>F. excelsior</i>	19.08.2011
Orlovšček	46°32'25" N, 16°19'44" E	<i>F. angustifolia</i>	23.08.2011
Željne	45°38'13" N, 14°54'43" E	<i>F. excelsior</i>	16.08.2011



Slika 11: Lokacije izbranih semenskih objektov

Figure 11: Location of selected ash seed collecting stands

3.5.2 Izbor in popis jesenovih dreves na raziskovalnih ploskvah

Izbor in popis jesenovih dreves na vsaki ploskvi je potekal po navodilu popisa ploskev M6 (metoda šestih najbližjih dreves), ki je opisan v priročniku za monitoring gozdov in gozdnih ekosistemov (Kovač, 2013). Na vsaki raziskovalni ploskvi smo torej izbrali šest središču ploskve najbližjih jesenovih dreves s prsnim premerom vsaj 10 cm. Izbrane jesene smo označili, jim določili socialni položaj, izmerili premer v prsni višini ter oddaljenost posameznega drevesa od središča ploskve, od koder smo določili tudi azimut posameznega drevesa. Vsakemu drevesu smo nato ocenili delež odmrle krošnje, ki pa ni enak oceni osutosti krošnje, kot jo definira priročnik (Kovač, 2013). Pri ocenjevanju poškodovanosti krošenj smo bili pozorni predvsem na tipične simptome jesenovega ožiga (odmiranje in sušenje poganjkov in vej), ocenjevali smo poškodovanost celotne krošnje, pri čemer nismo upoštevali le spodnjih najbolj zasenčenih delov krošnje. Posebej smo ocenili tudi delež prezgodaj odpadlega listja, ki je prav tako posledica okužbe z glivo *C. fraxinea*. Tako delež odmrle krošnje kot tudi delež prezgodaj odpadlega listja smo ocenili na 5 % natančno. Pri ocenjevanju smo uporabljali daljnogled, saj je bila večina izbranih dreves precej visokih. Ker v procesu propadanja jesenov ne sodeluje samo gliva *C. fraxinea*, smo bili pri ocenjevanju poškodovanosti jesenov pozorni tudi na kakršne koli znake oziroma simptome, ki bi kazali na delovanje katerega drugega škodljivega dejavnika. Zaradi tega delež odmrle krošnje predstavlja le oceno poškodovanosti krošnje zaradi jesenovega ožiga.

3.5.3 Analiza rezultatov

Rezultate (delež odmrle krošnje in delež prezgodaj odpadlega listja) smo analizirali z uporabo neparametričnega Kruskal-Wallisovega testa (Quinn in Keough, 2002), ki mu je sledil neparametrični post hoc test mnogoterih primerjav (Siegel in Castellan, 1988).

4 REZULTATI

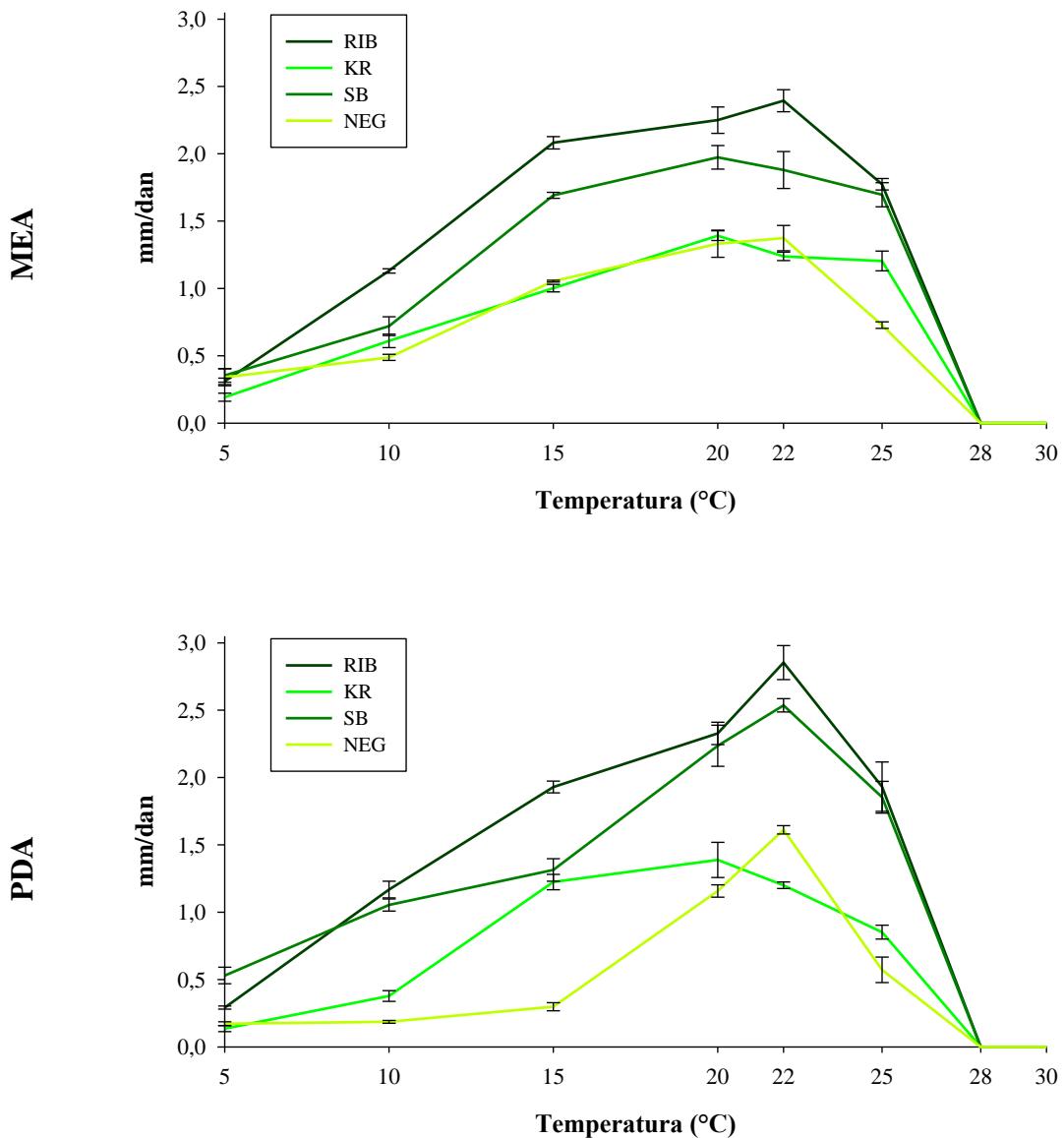
4.1 VPLIV TEMPERATURE NA GLIVO *Chalara fraxinea*

4.1.1 Vpliv temperature na rast glive *Chalara fraxinea* v čisti kulturi

Z raziskavami hitrosti rasti glive *C. fraxinea* v čisti kulturi smo ugotovili značilne razlike v hitrosti rasti pri različnih temperaturah ($F = 223,64$; $p < 0,001$), prav tako pa so bile ugotovljene značilne razlike v hitrosti rasti med različnimi izolati ($F = 3,85$; $p = 0,01$). Značilnih razlik v hitrosti rasti patogena na različnih gojiščih nismo odkrili ($F = 0,09$; $p = 0,77$).

Gliva je rasla različno hitro pri temperaturah 5, 10, 15, 20, 22 in 25 °C, pri temperaturah 28 in 30 °C pa v petih tednih opazovanj ni rasla (slika 12, preglednica 5). Značilne razlike ($p < 0,05$) v hitrosti rasti med različnimi temperaturami smo ugotovili za vse štiri izolate glive na obeh gojiščih (preglednica 5). Statistično značilne razlike ($p < 0,05$) v hitrosti rasti med različnimi izolati smo ugotovili pri vseh temperaturah na obeh gojiščih, le pri najnižji temperaturi (5 °C) na sladnem agarju ne.

Za izolat KR (obe gojišči) in izolat SB na sladilnem agarju je bila optimalna temperatura za rast 20 °C (preglednica 5, slika 12). Za izolata RIB in NEG (obe gojišči) ter izolat SB na krompirjevem agarju pa je bila rast v povprečju najhitrejša pri 22 °C. V povprečju je bila rast glive *C. fraxinea* na sladnem agarju največja pri 20 °C, in sicer 1,7 mm/dan. Na krompirjevem agarju pa je bila v povprečju največja hitrost (2,1 mm/dan) izmerjena pri temperaturi 22 °C. Največja povprečna hitrost rasti izolata RIB (2,9 mm/dan pri temperaturi 22 °C na gojišču PDA) je bila približno dvakrat večja od povprečne najhitrejše rasti izolata KR (1,4 mm/dan pri temperaturi 20 °C na gojišču MEA).



Slika 12: Hitrost radialne rasti kolonij štirih različnih izolatov glive *C. fraxinea* pri različnih temperaturah na gojiščih MEA in PDA. Prikazana so povprečja in standardne napake

Figure 12: Colony radial growth rate of four different *C. fraxinea* isolates at different temperatures on MEA and PDA. Means and standard errors are shown

Preglednica 5: Hitrost radialne rasti kolonij (mm/dan) glive *Chalara fraxinea* pri različnih temperaturah
*Table 5: Colony radial growth rate (mm/day) of *Chalara fraxinea* fungus at different temperatures*

	Izolat / Isolate	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C	22 °C	25 °C	28 °C	30 °C
MEA	KR	0,19 ± 0,03 A1 d2	0,61 ± 0,05 B c	1,00 ± 0,03 C b	1,39 ± 0,04 B a	1,24 ± 0,03 C a	1,20 ± 0,07 B ab	0 ± 0	0 ± 0
	NEG	0,34 ± 0,06 A c	0,49 ± 0,02 B c	1,05 ± 0,01 C a	1,33 ± 0,10 B a	1,37 ± 0,09 BC a	0,73 ± 0,02 C b	0 ± 0	0 ± 0
	RIB	0,31 ± 0,02 A d	1,13 ± 0,02 A c	2,08 ± 0,05 A a	2,25 ± 0,10 A a	2,39 ± 0,08 A a	1,77 ± 0,04 A b	0 ± 0	0 ± 0
	SB	0,34 ± 0,06 A c	0,72 ± 0,07 B b	1,69 ± 0,02 B a	1,97 ± 0,09 A a	1,88 ± 0,14 AB a	1,70 ± 0,09 A a	0 ± 0	0 ± 0
PDA	KR	0,29 ± 0,03 c3	0,74 ± 0,06 b	1,46 ± 0,10 a	1,74 ± 0,10 a	1,72 ± 0,11 a	1,35 ± 0,10 a	0 ± 0	0 ± 0
	NEG	0,14 ± 0,02 B d	0,38 ± 0,04 B c	1,22 ± 0,06 B a	1,39 ± 0,13 B ab	1,20 ± 0,02 C a	0,85 ± 0,05 B b	0 ± 0	0 ± 0
	RIB	0,17 ± 0,01 B c	0,19 ± 0,01 C c	0,30 ± 0,03 C c	1,16 ± 0,05 B b	1,61 ± 0,03 B a	0,57 ± 0,09 B c	0 ± 0	0 ± 0
	SB	0,29 ± 0,01 A e	1,17 ± 0,06 A d	1,93 ± 0,04 A c	2,33 ± 0,08 A ab	2,85 ± 0,13 A a	1,93 ± 0,18 A bc	0 ± 0	0 ± 0
	0,28 ± 0,04 e	0,70 ± 0,10 d	1,19 ± 0,14 cd	1,78 ± 0,13 ab	2,05 ± 0,16 a	1,30 ± 0,15 bc	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

¹ Hitrosti rasti med različnimi izolati pri isti temperaturi na določenem gojišču z istimi velikimi tiskanimi črkami niso znacilno različne (Games-Howell test, p = 0,05)/Growth rates between different isolates at the same temperature on a particular medium with the same uppercase letter are not significantly different (Games-Howell test, p = 0,05)

² Hitrosti rasti posameznega izolata pri različnih temperaturah z enakimi malimi tiskanimi črkami niso znacilno različne (Games-Howell test, p = 0,05)/Growth rates between the temperatures for the same isolate with the same lowercase letter are not significantly different (Games-Howell test, p = 0,05)

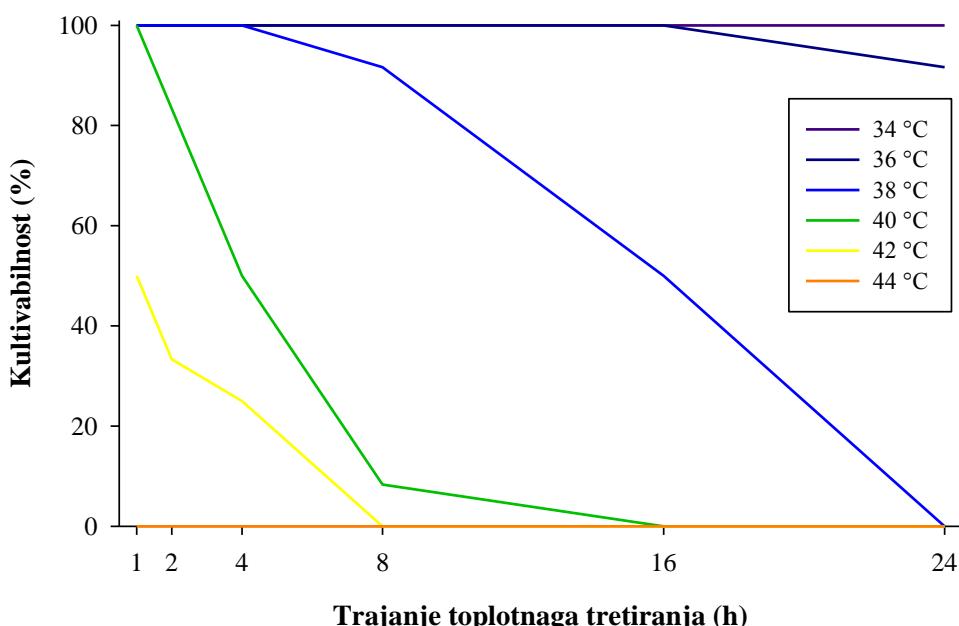
³ Hitrosti rasti vseh izolatov skupaj pri različnih temperaturah z enakimi odenbeljenimi malimi tiskanimi črkami niso znacilno različne (Games-Howell test, p = 0,05)/Growth rates between the temperatures of all isolates together with the same bold lowercase letter are not significantly different (Games-Howell test, p = 0,05)

4.1.2 Toplotna obdelava kultur glive *Chalara fraxinea*

Toplotna obdelava izbranih izolatov glive *C. fraxinea* je pokazala, da se kultivabilnost glive po obdelavi z višanjem temperature postopka ($p < 0,001$) oziroma podaljševanjem trajanja postopka ($p < 0,01$) značilno zmanjša. Med dejavnikoma temperatura in čas smo odkrili značilno interakcijo ($p < 0,001$), kar kaže na to, da se je z višanjem temperature obdelave kultivabilnost glive zmanjševala hitreje kot s podaljševanjem trajanja obdelave.

Segrevanja pri 34 in 36 °C praktično niso imela vpliva na kultivabilnost glive, saj je bila kultivabilnost glive 100 % po vseh segrevanjih, razen pri eni ponoviti izolata NEG, ki smo ga 24 ur segrevali pri 36 °C. Nasprotno pa smo ničto kultivabilnost glive dosegli z obdelavo pri 44 °C. Precepljanje glive je bilo neuspešno (rast glive iz precepljenih koščkov se v treh tednih ni pojavila) tudi po 24-urni obdelavi pri 38 °C, 16- in 24-urnem segrevanju pri 40 °C in štiri- ali večurni obdelavi pri 42 °C. Kultivabilnost glive *C. fraxinea* je prikazana na sliki 12.

Razlike v toleranci na segrevanje različnih izolatov glive so se pokazale po obdelavah na višjih temperaturah. Tako so bile npr. vse kulture izolata RIB po eno- in dvourni obdelavi pri temperaturi 42 °C kultivabilne, precepljanje kultur izolata NEG po istih segrevanjih pa je bilo neuspešno.



Slika 13: Kultivabilnost glive *C. fraxinea* po različnih toplotnih obdelavah

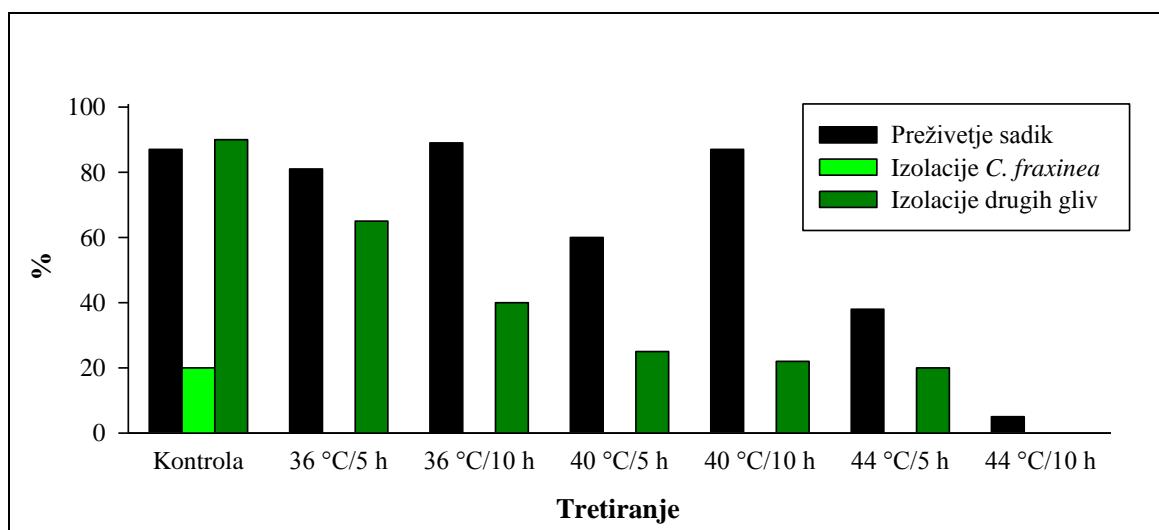
Figure 13: Cultivability of *C. fraxinea* after different heat treatments

4.1.3 Toplotna obdelava sadik in okuženih poganjkov velikega jesena (*F. excelsior*) v vodi

4.1.3.1 Segrevanje okuženih sadik velikega jesena

Delež preživelih neobdelanih okuženih sadik velikega jesena (*F. excelsior*), ki smo jih kot kontrolo posadili v eksperimentu aprila 2010, je znašal 87,5 %. Podobno preživetje smo ugotovili tudi pri sadikah, ki smo jih v istem eksperimentu 5 oziroma 10 ur segrevali v vodi pri 36 °C in ki smo jih 10 ur segrevali pri 40 °C. Toplotno obdelavo in sajenje je namreč preživilo med 80 in 87,5 % sadik. Omenjena segrevanja tako niso značilno zmanjšala preživetja sadik. Značilno manjše ($p < 0,05$) preživetje (60 %) je bilo ugotovljeno pri sadikah, ki smo jih pet ur obdelovali pri 40 °C. Še bolj pa sta sadikam škodovali segrevanji pri 44 °C, saj je bila stopnja preživetja le še 37% (5-urna obdelava) oziroma 5% (10-urna obdelava).

Glove *Chalara fraxinea* nam ni uspelo izolirati iz nobene sadike, ki je bila toplotno obdelana v vodi. Uspešnost izolacije omenjene glive je bila majhna tudi iz kontrolnih sadik, saj nam jo je uspelo izolirati le iz štirih od 20 neobdelanih sadik (slika 14, preglednica 6). Smo pa z izolacijami iz okuženih tkiv pridobili številne izolate drugih gliv (preglednica 6), med katerimi so bile najpogosteje izolirane glive iz rodu *Phomopsis* in gliva *Alternaria alternata*. Z višanjem temperature in daljšanjem trajanja obdelave je uspešnost izolacije drugih gliv padala (slika 14).



Slika 14: Delež preživelih sadik in uspešnost izolacij glive *C. fraxinea* in drugih gliv iz okuženih jesenovih sadik po toplotnih obdelavah v vodi aprila 2010

Figure 14: Share of survived saplings and isolation success of *C. fraxinea* and other fungi from diseased ash saplings after HW-treatments in April 2010

Preglednica 6: Uspešnost izolacije (%) glive *C. fraxinea* in drugih gliv iz okuženih tkiv velikega jesena po toplotnih obdelavah v vodi aprila 2010, novembra 2010 in marca 2011

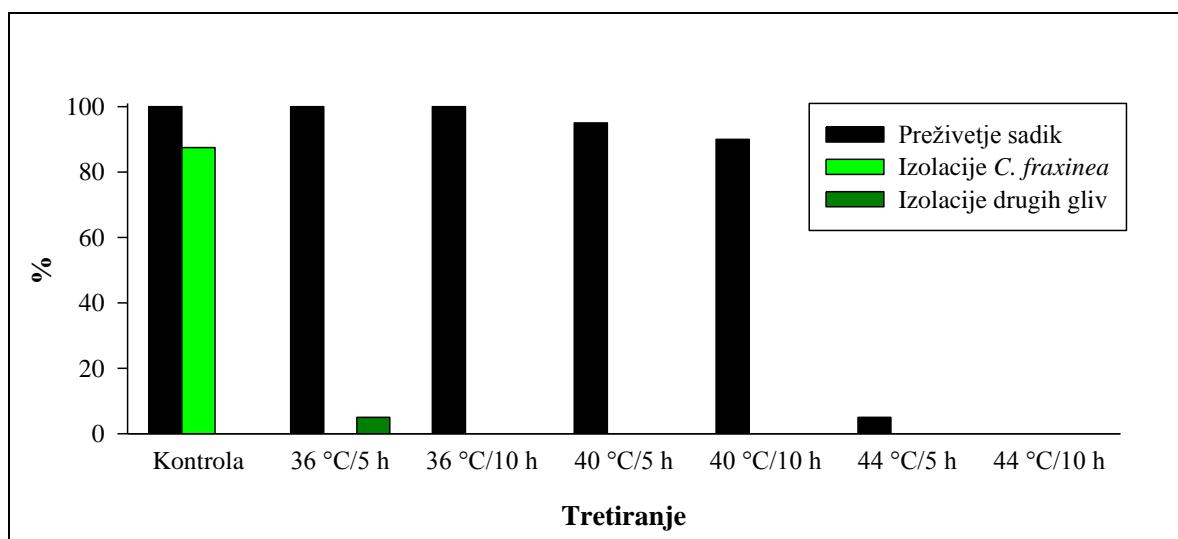
Table 6: Isolation success (%) of *C. fraxinea* and other fungi from diseased common ash tissues after HW-treatments in April 2010, November 2010 and March 2011

	Kontrola / Control	36 °C	40 °C	44 °C	Reprezentativni izolat / Representative isolate	GeneBank pristopna št. / GeneBank accession no.
	5 h	10 h	5 h	5 h	10 h	
April 2010/April 2010						
<i>Chalara fraxinea</i>	20	0	0	0	0	ZLVG 326 HE774485
<i>Alternaria alternata</i>	5	15	10	15	25	ZLVG 331 HE774489
<i>Bjerkandera adusta</i>	5	0	0	0	0	ZLVG 335 HE774493
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	10	10	0	0	0	ZLVG 324 HE774483
<i>Cadophora luteo-olivacea</i>	0	5	0	0	0	ZLVG 328 HE774476
<i>Diaporthe viticola</i>	20	0	10	0	0	ZLVG 336 HE774494
<i>Epicoccum nigrum</i>	5	0	0	0	0	ZLVG 323 HE774482
<i>Lepiosphaeria</i> sp.	5	5	0	0	0	ZLVG 320 HE774479
<i>Leptospora rubella</i>	10	0	0	0	0	ZLVG 321 HE774480
<i>Lophiostoma corticola</i>	5	0	0	0	0	ZLVG 319 HE774478
<i>Phoma</i> sp.	5	0	0	0	0	ZLVG 322 HE774481
<i>Phomopsis</i> sp.	25	40	20	10	0	ZLVG 329 HE774487
<i>Phomopsis theicola</i>					0	ZLVG 325 HE774484
<i>Strobilurus</i> sp.					0	ZLVG 327 HE774486
November 2010/November 2010						
<i>Chalara fraxinea</i>	20	10	15	0	0	10 ZLVG 334 HE774492
<i>Hypoxyylon howeanum</i>	0	0	0	5	0	0 ZLVG 318 HE774477
Marec 2011/March 2011						
<i>Chalara fraxinea</i>	87.5	0	0	0	0	0 ZLVG 332 HE774490
<i>Biscogniauxia nummularia</i>	0	0	0	5	0	0 ZLVG 330 HE774488
November 2010/November 2010						
<i>Chalara fraxinea</i>	100	30	0	5	0	0 ZLVG 337 HE774495

4.1.3.2 Segrevanje vizualno zdravih jesenovih sadik in okuženih poganjkov velikega jesena

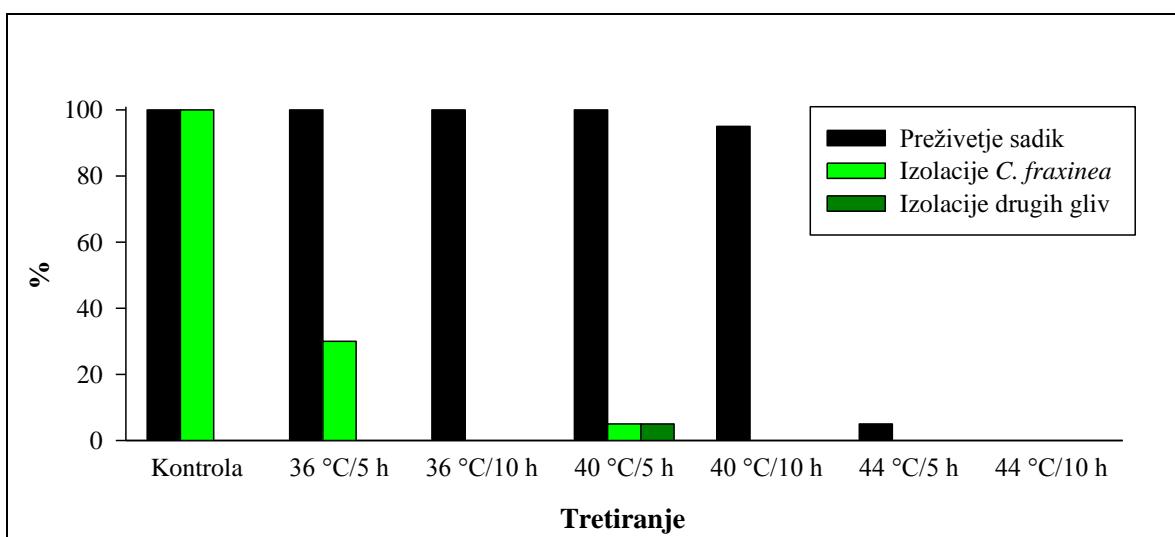
Pet- in 10-urne toplotne obdelave z vodo pri 36 in 40 °C niso značilno zmanjšale preživetja sadik velikega jesena (*F. excelsior*). V obeh eksperimentih, tako novembra 2010 kot tudi marca 2011, so sajenje preživele vse kontrolne sadike, pa tudi vse sadike, ki smo jih pred saditvijo pet oziroma 10 ur segrevali pri 36 °C. Preživetje sadik pa je bilo veliko tudi po segrevanju pri 40 °C (pet in 10 ur), saj je toplotno obdelavo in sajenje preživilo več kot 90 % sadik (sliki 14 in 15). Preživetje sadik pa je značilno ($p < 0,05$) upadlo po toplotnih obdelavah pri 44 °C, saj je v obeh eksperimentih preživila samo po ena sadika, ki je bila segrevana pet ur, medtem ko nobena sadika ni preživila 10-urnega segrevanja.

Uspešnost izolacije *C. fraxinea* iz kontrolnih (neobdelanih) poganjkov z značilnimi nekrozami jesenovega ožiga je bila precej velika, saj je novembra 2010 znašala 87,5 % (slika 15, preglednica 6), marca 2011 pa je bila celo 100% (slika 16, preglednica 6). Prav nasprotno pa je bila uspešnost izolacije glive *C. fraxinea* zelo majhna iz toplotno obdelanih poganjkov. Novembra 2010 patogena nismo uspeli izolirati prav iz nobenega obdelanega poganjka (slika 15, preglednica 6), medtem ko je bila marca 2011 izolacija uspešna le iz šestih poganjkov, ki smo jih pet ur segrevali pri 36 °C (30%) in iz enega poganjka, ki smo ga pet ur segrevali pri 40 °C (5%) (slika 16, preglednica 6). Uspešnost izolacije drugih gliv je bila v primerjavi s poskusom v aprilu 2010 zelo majhna. Tako smo po toplotnih obdelavah novembra 2010 iz jesenovih poganjkov z izolacijami pridobili le en izolat glive *Hypoxyylon howeanum*, marca 2011 pa le en izolat glive *Biscogniauxia nummularia* (preglednica 6).



Slika 15: Delež preživelih sadik ter uspešnost izolacije glive *C. fraxinea* in drugih gliv iz okuženih jesenovih poganjkov po toplotnih obdelavah v novembra 2010

Figure 15: Share of survived saplings and isolation success of *C. fraxinea* and other fungi from diseased ash shoots after HW-treatments in November 2010



Slika 16: Delež preživelih sadik ter uspešnost izolacije glive *C. fraxinea* in drugih gliv iz okuženih jesenovih poganjkov po toplotnih obdelavah v vodi marca 2011

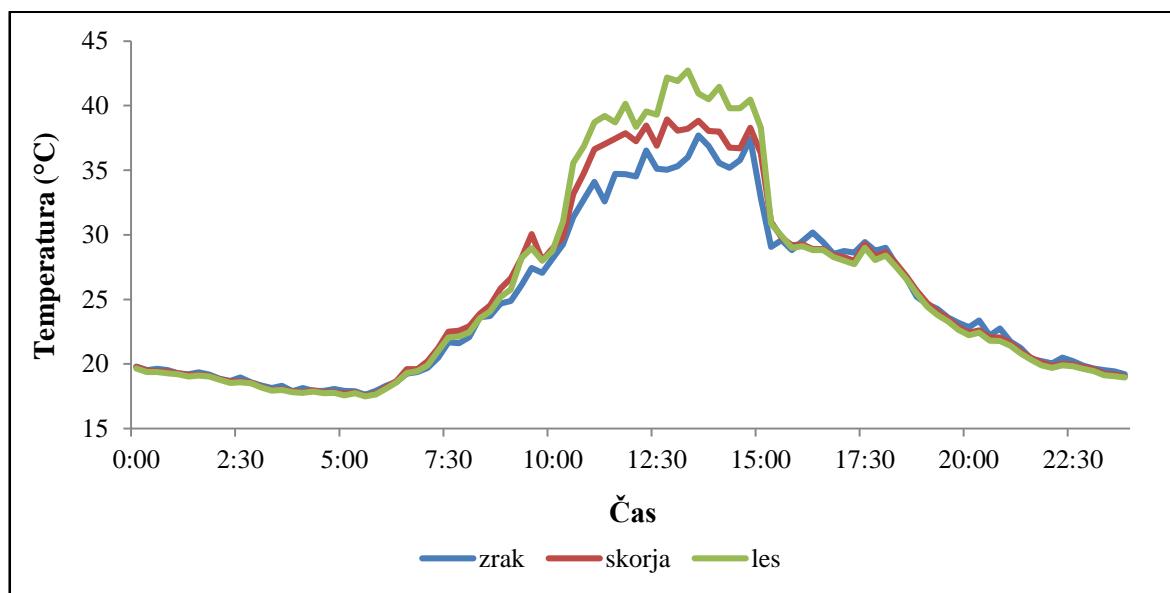
Figure 16: Share of survived saplings and isolation success of *C. fraxinea* and other fungi from diseased ash shoots after HW-treatments in March 2011

4.1.4 Spremljanje temperature na sadikah velikega jesena (*F. excelsior*)

V oblačnih in hladnejših dneh razlik v temperaturi med različnimi merilnimi mesti (zrak, skorja, les) ni bilo. Prav nasprotno pa so bile v dneh z vročim in sončnim vremenom te razlike velike (slika 17). V najbolj vročih obdobjih so bile praviloma najvišje dnevne temperature lesa višje od najvišjih dnevnih temperatur skorje, le te pa višje od najvišjih dnevnih temperatur zraka v okolici sadik. Tako je npr. 23. avgusta 2011 (dan z najvišjo izmerjeno temperaturo) najvišja izmerjena temperatura lesa na eni sadiki znašala 42,7 °C, medtem ko je bila najvišja izmerjena temperatura skorje na isti sadiki 38,9 °C, najvišja temperatura zraka v okolici te sadike pa 37,7 °C (slika 17).

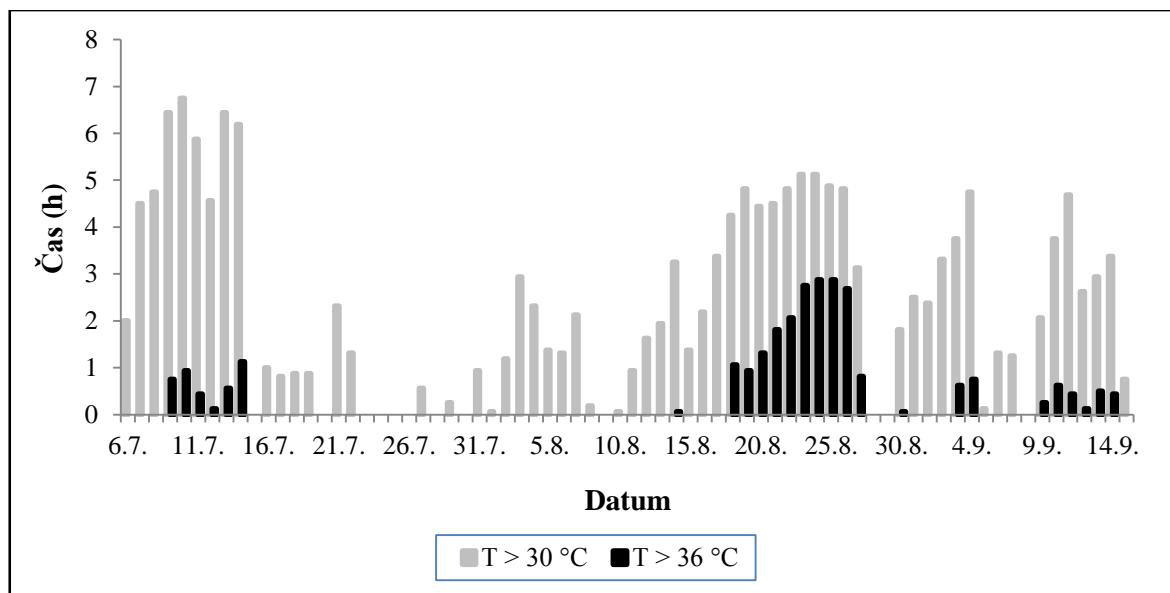
Tudi razlike v temperaturi merilnih mest istega tipa med različnimi sadikami so bile največje v dneh z vročim in sončnim vremenom. Razlike v temperaturi zraka med različnimi sadikami so bile vseeno manjše od razlik v temperaturi skorje oziroma lesa. Tako so 23. avgusta 2011 najvišje temperature zraka v okolici različnih sadik variirale med 34,9 in 37,7 °C, najvišje temperature skorje oziroma lesa pa med 33,8 in 40,0 °C oziroma 37,0 in 42,7 °C. Opazovanja sadik v obdobju merjenja temperatur so pokazala, da je bila najvišja temperatura izmerjena na sadiki, ki je bila najbolj izpostavljena soncu.

V najbolj vročih dneh je temperatura lesa v povprečju presegala 30 °C tudi več kot 5 ur oziroma je več kot dve uri in pol presegala 36 °C (slika 18). Najbolj ekstremne razmere so bile tudi v tem primeru ugotovljeni 23. avgusta 2011, ko je temperatura lesa sadike, ki je bila najbolj izpostavljena soncu, presegala 38 °C več kot 4 ure (slika 17).



Slika 17: Temperatura zraka, skorje in lesa, merjena na sadiki velikega jesena dne 23. avgusta 2011

Figure 17: Air bark and wood temperature of *Fraxinus excelsior* sapling on the 23rd of August 2011



Slika 18: Povprečno dnevno trajanje obdobjij s temperaturo lesa nad 30 in 36 °C

Figure 18: Mean daily duration time of wood temperature above 30 and 36 °C

4.2 VPLIV IZBRANIH FUNGICIDOV IN UREE NA GLIVO *Chalara fraxinea*

4.2.1 Preliminarni test vpliva fungicidov na rast glive *C. fraxinea* v čisti kulturi

V preliminarnem testu je pet fungicidov popolnoma zavrlo rast glive *C. fraxinea*. To so bila sredstva z aktivnimi snovmi karbendazim, prokloraz, kaptan, thiram in klorotalonil. Manj uspešno so rast glive zavirala sredstva z aktivnimi snovmi pirimetanil, iprodion in fenheksamid. Izmed slednjih je rast glive najučinkoviteje zaviral iprodion, saj je povprečni premer kolonij glive na gojiščih s to aktivno snovjo znašal le 13 % povprečnega premera kolonij glive na kontrolnih gojiščih. Ta vrednost je na gojiščih, ki smo jim dodali aktivni snovi pirimetanil in fenheksamid, znašala 51 % oziroma 88 %.

4.2.2 Podrobni test vpliva petih izbranih fungicidov na rast glive *C. fraxinea* v čisti kulturi

Analiza rezultatov je pokazala velike razlike v učinkovanju petih aktivnih snovi, ki smo jih vključili v glavni test ($F = 118,85$; $p < 0,001$). Upoštevajoč vse aktivne snovi skupaj, razlik v občutljivosti med posameznimi izolati glive nismo odkrili, smo pa odkrili značilno interakcijo ($F = 9,25$; $p < 0,001$) med dejavnikoma fungicid in izolat. Tako smo kasneje s post hoc testom ugotovili, da značilne razlike ($p < 0,05$) v občutljivosti na določene aktivne snovi med izolati vendarle obstajajo (preglednica 7).

Na vseh koncentracijah je rast glive *C. fraxinea* najslabše zavirala aktivna snov kaptan (slika 19, preglednica 7). Primerjava rasti na gojiščih z različnimi koncentracijami kaptana in na kontrolnih gojiščih (slika 19) je pokazala, da je gliva *C. fraxinea* pri koncentracijah 0,1 mg/l in 1 mg/l rasla bolje kot na kontrolnih gojiščih. Statistično značilno ($p < 0,05$) bolje je sicer rasla le na najmanjši koncentraciji (0,1 mg/l), medtem ko smo značilno zmanjšano rast v primerjavi s kontrolami ugotovili le na gojišču z največjo koncentracijo omenjene aktivne snovi (10 mg/l). Razlik v rasti med izolati na gojiščih, ki jim je bil dodan kaptan, nismo ugotovili.

Nekoliko bolj učinkovita pri zaviranju rasti glive *C. fraxinea* je bila aktivna snov tiram, ki je značilno zmanjšala rast glive že pri koncentraciji 1 mg/l. Po štirinajstih dneh je povprečni premer kolonij glive pri tej koncentraciji znašal le 61 % povprečnega premera kolonij na kontrolnih gojiščih, medtem ko je ta vrednost na največji testirani koncentraciji (10 mg/l) znašala le še 21 % (preglednica 7). Ugotovili smo tudi značilne razlike med različnimi izolati glive. Iz preglednice 7 je razvidno, da je tiram najučinkoviteje zaviral rast izolata SB.

Preglednica 7: Premer (povprečje ± st. napaka) kolonij gline *C. fraxinea* na gojiščih s tremi različnimi koncentracijami petih različnih aktivnih snovi. Prikazane so relativne vrednosti glede na rast gline na kontrolnih gojiščih

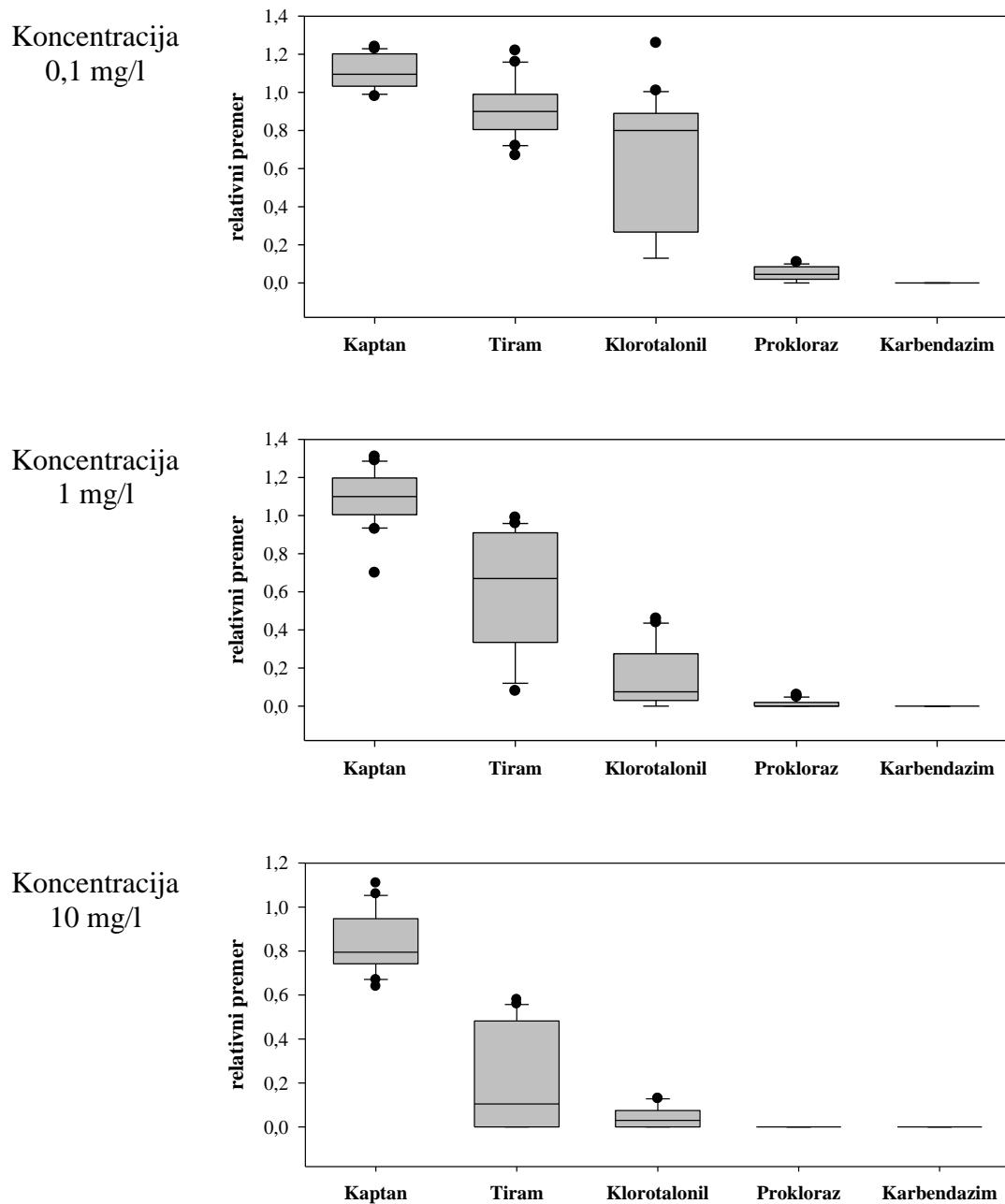
Table 7: Chalara fraxinea colony diameter (mean ± SE) on growth media amended with three different concentrations of five different active ingredients. Relative values according to fungal growth on control plates are shown

Aktivna snov/Active ingredient	Izolat/Isolate NEG	Izolat/Isolate RIB	Izolat/Isolate SB	Izolat/Isolate KR	Skupaj/All
Koncentracija/Concentration: 0,1 mg/l					
Kaptan	1,04 ± 0,04 a ¹ A ²	1,12 ± 0,08 a A	1,13 ± 0,10 a A	1,16 ± 0,10 a A	1,11 ± 0,09 A³
Tiram	1,09 ± 0,12 a A	0,96 ± 0,05 ab B	0,87 ± 0,07 b B	0,74 ± 0,05 c B	0,92 ± 0,15 B
Klorotalonil	0,80 ± 0,12 a B	0,84 ± 0,12 a B	0,93 ± 0,19 a AB	0,13 ± 0,01 b C	0,68 ± 0,35 B
Prokloraz	0 ± 0 b C	0,08 ± 0,03 a C	0,02 ± 0,00 b C	0,06 ± 0,00 b D	0,04 ± 0,04 C
Karbendazim	0 ± 0 a C	0 ± 0 a D	0 ± 0 a D	0 ± 0 a E	0 ± 0 D
Koncentracija/Concentration: 1 mg/l					
Kaptan	1,07 ± 0,08 a A	1,10 ± 0,23 a A	1,11 ± 0,08 a A	1,12 ± 0,17 a A	1,10 ± 0,14 A
Tiram	0,76 ± 0,11 b B	0,95 ± 0,03 a A	0,15 ± 0,08 c B	0,59 ± 0,09 b B	0,61 ± 0,31 B
Klorotalonil	0,17 ± 0,17 a C	0,19 ± 0,13 a B	0,21 ± 0,23 a B	0,03 ± 0,01 a C	0,15 ± 0,16 C
Prokloraz	0 ± 0 a C	0,02 ± 0,02 a B	0,01 ± 0,01 a B	0,02 ± 0,02 a CD	0,01 ± 0,02 D
Karbendazim	0 ± 0 a C	0 ± 0 a B	0 ± 0 a B	0 ± 0 a D	0 ± 0 D
Koncentracija/Concentration: 10 mg/l					
Kaptan	0,91 ± 0,12 a A	0,84 ± 0,20 a A	0,79 ± 0,06 a A	0,81 ± 0,13 a A	0,84 ± 0,13 A
Tiram	0,20 ± 0,19 bc B	0,54 ± 0,03 a A	0,01 ± 0,01 c B	0,10 ± 0,01 b B	0,21 ± 0,22 B
Klorotalonil	0,01 ± 0,02 b B	0,11 ± 3 a B	0,04 ± 0,03 b B	0 ± 0 b C	0,04 ± 0,05 C
Prokloraz	0 ± 0 a B	0 ± 0 a C	0 ± 0 a B	0 ± 0 a C	0 ± 0 D
Karbendazim	0 ± 0 a B	0 ± 0 a C	0 ± 0 a B	0 ± 0 a C	0 ± 0 D

¹ premeri kolonij različnih izolatov na gojiščih z dodatkom enake koncentracije iste aktivne snovi z enako malo tiskano črko niso značilno različni (Games-Howell test, p = 0,05)/colony diameters of distinct isolates on media amended with the same concentration of the same active ingredient with the same lowercase letter are not significantly different (Games-Howell test, p = 0,05)

² premeri kolonij istih izolatov na gojiščih z dodatkom enake koncentracije različnih aktivnih snovi z enako veliko tiskano črko niso značilno različni (Games-Howell test, p = 0,05)/colony diameters of the same isolates on media amended with the same concentration of different active ingredient with the same uppercase letter are not significantly different (Games-Howell test, p = 0,05)

³ premeri kolonij vseh izolatov skupaj na gojiščih z dodatkom enake koncentracije različnih aktivnih snovi z enako krepko veliko tiskano črko niso značilno različni (Games-Howell test, p = 0,05)/colony diameters of all isolates together on media amended with the same concentration of different active ingredient with the same bold uppercase letter are not significantly different (Games-Howell test, p = 0,05)



Slika 19: Premer kolonij glive *Chalara fraxinea* na gojiščih s tremi različnimi koncentracijami petih različnih aktivnih snovi. Prikazane so relativne vrednosti glede na rast glive na kontrolnih gojiščih

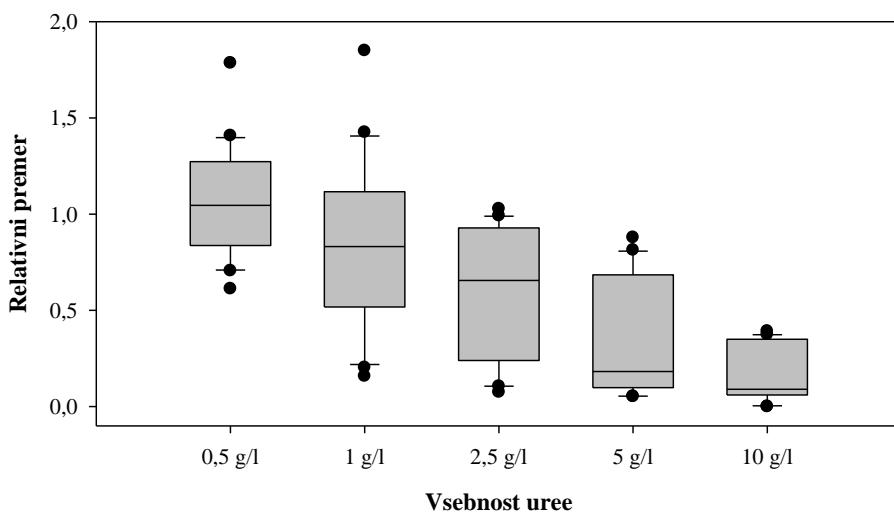
Figure 19: *Chalara fraxinea* colony diameter on growth media amended with three different concentrations of five different active ingredients. Relative values according to fungal growth on control plates are shown

Klorotalonil je značilno zmanjšal rast gline *C. fraxinea* že na najmanjši koncentraciji (0,1 mg/l). Glavni razlog za to, da je bil povprečni premer kolonij na najmanjši koncentraciji značilno manjši ($p < 0,05$) od povprečnega premera kolonij na kontrolnem gojišču, gre pripisati veliki občutljivosti izolata KR (preglednica 7). Povprečni premer kolonij tega izolata je namreč na omenjeni koncentraciji znašal le 13 % povprečnega premera kolonij na kontrolnih gojiščih. Pri koncentracijah 1 in 10 mg/l je klorotalonil izjemno učinkovito zaviral tudi druge izolate gline, ki smo jih vključili v test. Povprečni premer kolonij (vseh izolatov skupaj) na teh koncentracijah je tako znašal le še 15 % oziroma 4 % povprečnega premera kolonij na gojiščih brez dodane aktivne snovi.

Najučinkoviteje sta rast gline *C. fraxinea* zavirali aktivni snovi prokloraz in karbendazim (preglednica 7, slika 19). Prokloraz je pri največji koncentraciji (10 mg/l) popolnoma preprečil rast gline, medtem ko je povprečni premer kolonij pri koncentracijah 1 in 0,1 mg/l znašal le 4 % oziroma 1 % povprečnega premera kolonij na kontrolnem gojišču. Večjih razlik med izolati nismo ugotovili, nekoliko je izstopal le izolat RIB. Karbendazim je popolnoma preprečil rast gline v vseh testiranih koncentracijah.

4.2.3 Vpliv uree na rast glive *C. fraxinea* v čisti kulturi

Analiza rezultatov je pokazala značilne razlike med testiranimi koncentracijami uree ($F = 47,84$; $p < 0,001$). Če upoštevamo vse izolate skupaj, vidimo, da je gliva *C. fraxinea* v povprečju na gojiščih z najmanjšo koncentracijo uree (0,5 g/l) rasla bolje kot na kontrolnih gojiščih (slika 20), vendar razlike niso bile statistično značilne. Značilno ($p < 0,05$) počasnejšo rast je gliva v primerjavi s kontrolnimi gojišči prikazala na gojiščih s koncentracijo uree 2,5; 5 in 10 g/l.



Slika 20: Premer kolonij glive *Chalara fraxinea* na gojiščih z različno vsebnostjo uree. Prikazane so relativne vrednosti glede na rast glive na kontrolnih gojiščih

Figure 20: *Chalara fraxinea* colony diameter on growth media with different content of urea. Relative values according to fungal growth on control plates are shown

Ugotovili smo tudi velike razlike med izolati glive *C. fraxinea* ($F = 9,30$; $p < 0,001$). Te razlike so bile očitne pri vseh testiranih koncentracijah (preglednica 8, slika 21). Najhitreje je na gojiščih z dodatkom uree rasel izolat SB. Povprečni premer kolonij omenjenega izolata je bil le na gojiščih z največjo koncentracijo uree (10 g/l) značilno ($p < 0,05$) manjši od povprečnega premera na kontrolnih gojiščih. Na vseh koncentracijah je nekoliko slabše od izolata SB rasel izolat RIB. Kljub vsemu pa zaradi velikih razlik v rasti posameznih replik tega izolata značilnih razlik med rastjo na kontrolnih gojiščih in gojiščih z dodatkom katere koli koncentracije uree nismo odkrili. Posebej občutljiv na dodatek uree pa je bil izolat NEG, ki je statistično slabšo rast prikazal že na gojiščih, ki jim je bil dodan 1 g uree (slika 21).

Preglednica 8: Premer (povprečje ± st. napaka) kolonij glive *C. fraxinea* na gojiščih z različno vsebnostjo uree.
Prikazane so relativne vrednosti glede na rast glive na kontrolnih gojiščih

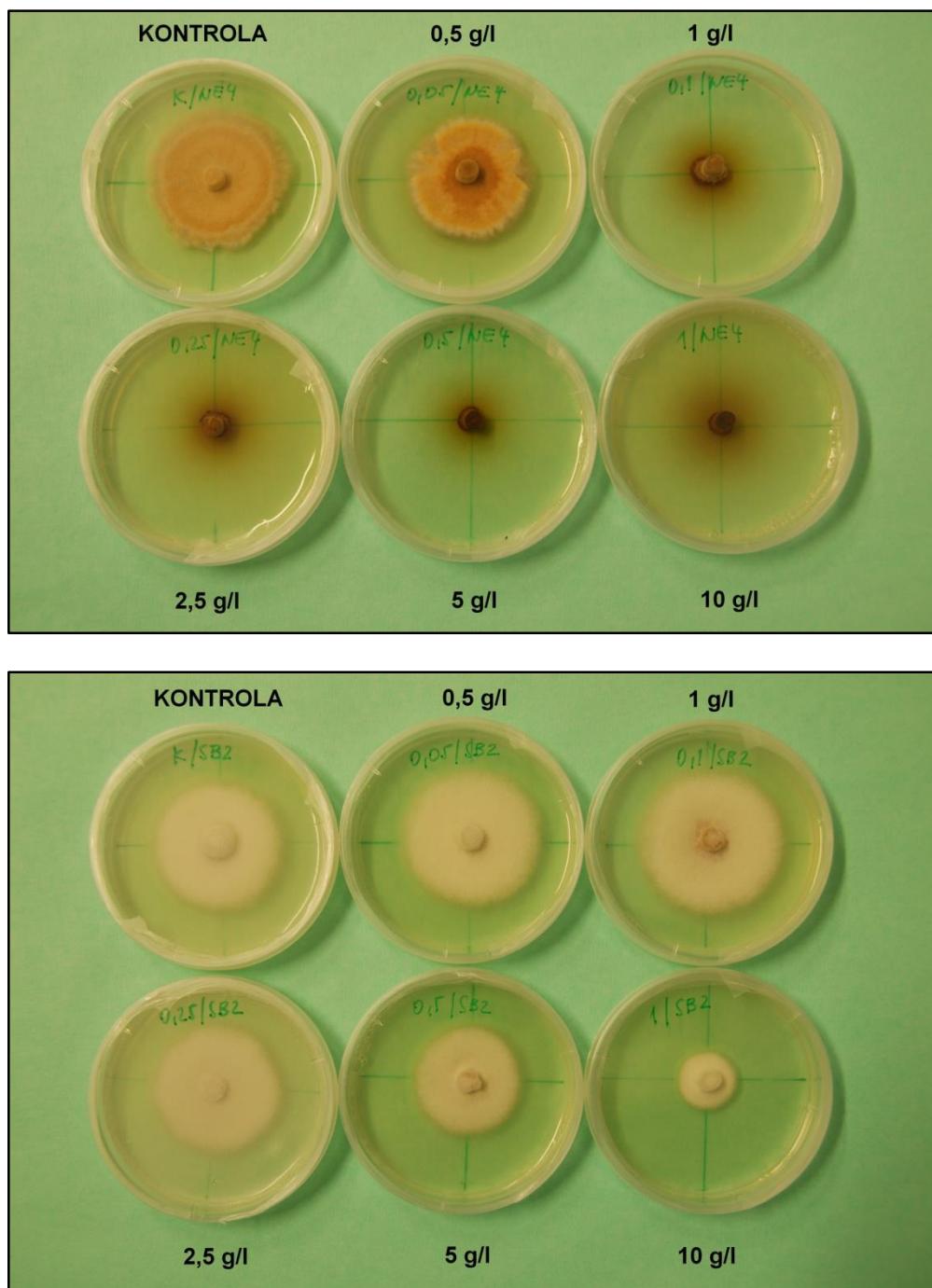
Table 8: Chalara fraxinea colony diameter (mean ± SE) on growth media amended with different concentrations of urea. Relative values according to fungal growth on control plates are shown

Koncentracija/ <i>Concentration</i>	Izolat/Isolate <i>NEG</i>	Izolat/Isolate <i>KR</i>	Izolat/Isolate <i>RIB</i>	Izolat/Isolate <i>SB</i>	Skupaj/All <i>Skupaj/All</i>
0,5 g/l	1,07 ± 0,03 a A	0,78 ± 0,03 b A	1,20 ± 0,19 ab A	1,23 ± 0,07 a A	1,07 ± 0,06 A
1 g/l	0,33 ± 0,07 c B	0,78 ± 0,06 b A	1,05 ± 0,21 abc AB	1,20 ± 0,06 a A	0,84 ± 0,09 AB
2,5 g/l	0,14 ± 0,03 b B	0,58 ± 0,10 a AB	0,69 ± 0,12 a AB	0,97 ± 0,02 a A	0,60 ± 0,08 BC
5 g/l	0,07 ± 0,01 c B	0,14 ± 0,01 b BC	0,40 ± 0,08 bc AB	0,78 ± 0,03 a B	0,35 ± 0,07 CD
10 g/l	0,06 ± 0,01 b B	0,05 ± 0,02 b C	0,17 ± 0,05 ab B	0,37 ± 0,01 a C	0,16 ± 0,03 D

¹ premeri kolonij različnih izolatov na gojiščih z dodatkom enake koncentracije uree z enako malo tiskano črko niso značilno različni (Games-Howell test, p = 0,05)/*colony diameters of distinct isolates on media amended with the same concentration of urea with the same lowercase letter are not significantly different (Games-Howell test, p = 0,05)*

² premeri kolonij istih izolatov na gojiščih z dodatkom različne koncentracije uree z enako veliko tiskano črko niso značilno različni (Games-Howell test, p = 0,05)/*colony diameters of the same isolates on media amended with different concentration of urea with the same uppercase letter are not significantly different (Games-Howell test, p = 0,05)*

³ premeri kolonij vseh izolatov skupaj na gojiščih z dodatkom različne koncentracije uree z enako krepko veliko tiskano črko niso značilno različni (Games-Howell test, p = 0,05)/*colony diameters of all isolates together on media amended with different concentration of urea with the same bold uppercase letter are not significantly different (Games-Howell test, p = 0,05)*



Slika 21: Rast dveh različnih izolatov glive *C. fraxinea* na gojiščih z različno vsebnostjo uree. Izolat NEG je v primerjavi s kontrolnimi gojišči značilno manj rasel že na gojišču, ki mu je bil dodan 1 g uree, izolat SB pa je značilno slabše uspeval le na gojišču z največjo koncentracijo uree (10 g/l)

*Figure 21: Growth of two distinct *C. fraxinea* isolates on growth media with different content of urea. Compared to control growth media, isolate NEG showed decrease in growth already at urea concentration 1 g/l, while isolate SB grew significantly slower only at the highest urea concentration (10 g/l)*

4.2.4 Vpliv izbranih fungicidov na oblikovanje apotecijev glive *H. pseudoalbidus*

Apoteciji glive so se razvili na več kot 97 % kontrolnih pecljev. V povprečju se je na enem centimetru neobdelanih pecljev razvilo 3,84 apotecija. Obdelava z različnimi aktivnimi snovmi so negativno vplivala na število razvitih trosič glive, saj je bilo število razvitih apotecijev po vseh različnih obdelavah manjše od števila apotecijev, ki so se razvili na kontrolnih pecljih (preglednica 9).

Preglednica 9: Število apotecijev (N/cm), ki so se oblikovali na jesenovih pecljih po 24-urnih obdelavah z različnimi koncentracijami petih različnih aktivnih snovi. Prikazana so povprečja in standardne napake

Table 9: Number of apothecia (N/cm) developed on ash petioles after 24-hours treatments with different concentrations of five different active ingredients. Means and standard errors are shown

Koncentracija/ <i>Concentration</i>	Aktivna snov/Active ingredient				
	Kaptan	Tiram	Klorotalonil	Prokloraz	Karbendazim
Kontrola/ <i>Control</i>			3,84 ± 0,39		
0,01 mg/l				2,55 ± 0,26 a ¹ A ²	3,15 ± 0,42 a A
0,1 mg/l	3,20 ± 0,30 a A	3,37 ± 0,32 a A	3,09 ± 0,43 a A	2,17 ± 0,29 a A * ³	2,51 ± 0,27 a A
1 mg/l	3,28 ± 0,37 a A	2,76 ± 0,38 ab AB	2,55 ± 0,35 ab AB	1,71 ± 0,25 b A *	0,05 ± 0,02 c B *
10 mg/l	2,41 ± 0,34 a A	1,83 ± 0,35 ab BC *	2,02 ± 0,32 a AB *	0,76 ± 0,14 b B *	0,00 ± 0,00 c B *
100 mg/l	2,29 ± 0,35 a A *	1,37 ± 0,26 a C *	1,51 ± 0,30 a B *		

¹vrednosti pri enaki koncentraciji različnih aktivnih snovi z enakimi malimi tiskanimi črkami niso značilno različne (Games-Howell test, p = 0,05)/values at the same concentration of different active ingredient with the same lowercase letter are not significantly different (Games-Howell test, p = 0,05)

²vrednosti pri različnih koncentracijah enake aktivne snovi z enakimi velikimi tiskanimi črkami niso značilno različne (Games-Howell test, p = 0,05)/values at the different concentration of the same active ingredient with the same uppercase letters are not significantly different (Games-Howell test, p = 0,05)

³vrednosti z zvezdico so značilno različne od kontrolne vrednosti (Games-Howell test, p = 0,05)/values with the asterisk are significantly different from control value (Games-Howell test, p = 0,05)

Če primerjamo pet testiranih aktivnih snovi na treh različnih koncentracijah skupaj (0,1; 1 in 10 mg/l), ugotovimo statistično značilne razlike v učinkovitosti zaviranja razvoja apotecijev ($F = 2,53$; $p = 0,03$). Če smo upoštevali vse aktivne snovi skupaj, razlik med koncentracijami nismo odkrili ($F = 2,28$; $p = 0,10$), smo pa odkrili značilno ($F = 5,57$; $p < 0,001$) interakcijo med dejavnikoma aktivna snov in koncentracija. Značilne razlike ($p < 0,05$) med koncentracijami za določene aktivne snovi smo tako ugotovili s post hoc testom (preglednica 9).

Tudi v tem poskusu je razvoj glive najučinkoviteje zatirala aktivna snov karbendazim. Na pecljih, ki so bili obdelani s koncentracijo 1 mg/l, se je razvilo le nekaj apotecijev, medtem

ko je koncentracija 10 mg/l popolnoma preprečila razvoj trosišč. Karbendazim je bil pri manjših koncentracijah (0,01 in 0,1 mg/l) manj učinkovit in ni značilno zmanjšal števila razvitih apotecijev.

Druga po učinkovitosti zatiranja razvoja apotecijev je bila aktivna snov prokloraz. Pri koncentraciji 0,1 mg/l je bila celo edina snov, ki je v primerjavi s kontrolnimi peclji značilno ($p < 0,05$) zmanjšala število razvitih trosišč. Pri večjih koncentracijah je bilo to zmanjšanje še bolj izrazito, vendar značilno manjše ($p < 0,05$) kot pri aktivni snovi karbendazim. Kljub vsemu se je na pecljih, ki so bili obdelani s koncentracijo 10 mg/l, še vedno razvilo 0,76 apotečija na centimeter peclja (preglednica 9).

Preglednica 10: Povprečna površina trosovnic apotecijev (mm^2/cm), ki so se oblikovali na jesenovih pecljih po 24-urnih obdelavah z različnimi koncentracijami petih različnih aktivnih snovi. Prikazana so povprečja in standardne napake

Table 10: Average disc area (mm^2/cm) of apothecia developed on ash petioles after 24-hours treatments with different concentrations of five different active ingredients. Means and standard errors are shown

Koncentracija/ <i>Concentration</i>	Aktivna snov/Active ingredient				
	Kaptan	Tiram	Klorotalonil	Prokloraz	Karbendazim
Kontrola/ <i>Control</i>	$6,46 \pm 0,66$				
0,01 mg/l				$4,26 \pm 0,44$ b ¹ A ²	$9,56 \pm 1,27$ a A
0,1 mg/l	$6,21 \pm 0,57$ ab A	$6,17 \pm 0,58$ ab A	$8,41 \pm 1,17$ ab A	$5,61 \pm 0,74$ b A	$9,56 \pm 1,02$ a A
1 mg/l	$6,33 \pm 0,71$ a A	$4,51 \pm 0,62$ a AB	$4,01 \pm 0,55$ a B	$4,15 \pm 0,60$ a AB	$0,47 \pm 0,19$ b B *
10 mg/l	$6,87 \pm 0,97$ a A	$4,40 \pm 0,83$ ab AB	$5,66 \pm 0,89$ a AB	$2,17 \pm 0,40$ b B * ³	$0,00 \pm 0,00$ c B *
100 mg/l	$5,62 \pm 0,85$ a A	$3,28 \pm 0,63$ a B *	$3,92 \pm 0,77$ a B		

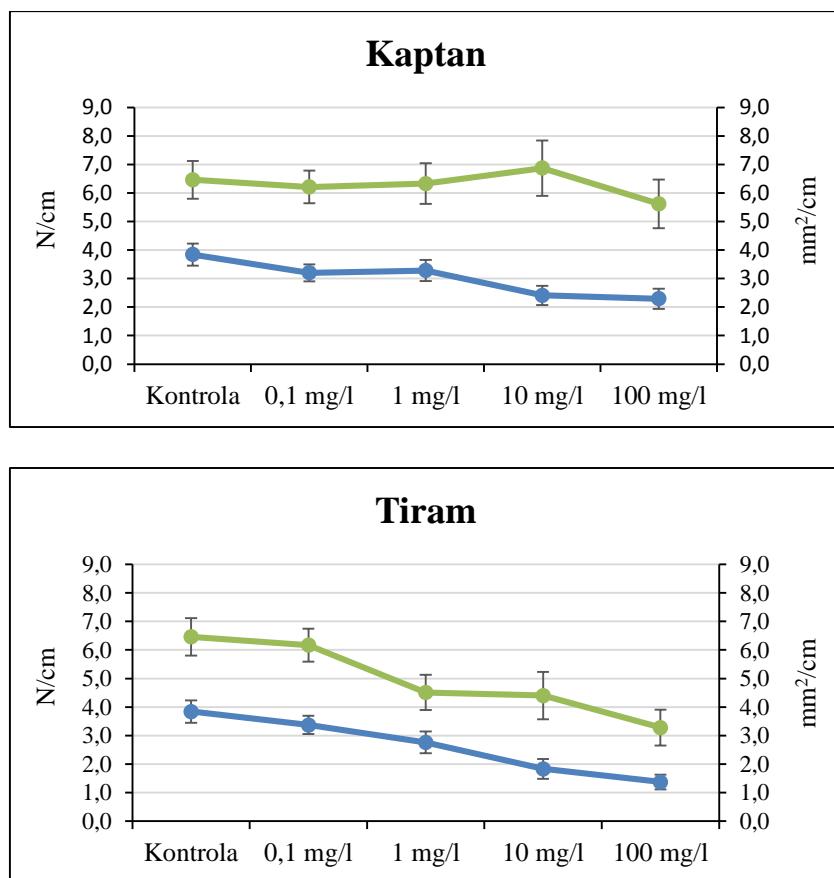
¹vrednosti pri enaki koncentraciji različnih aktivnih snovi z enakimi malimi tiskanimi črkami niso značilno različne (Games-Howell test, $p = 0,05$)/values at the same concentration of different active ingredient with the same lowercase letter are not significantly different (Games-Howell test, $p = 0,05$)

²vrednosti pri različnih koncentracijah enake aktivne snovi z enakimi velikimi tiskanimi črkami niso značilno različne (Games-Howell test, $p = 0,05$)/values at the different concentration of the same active ingredient with the same uppercase letters are not significantly different (Games-Howell test, $p = 0,05$)

³vrednosti z zvezdico so značilno različne od kontrolne vrednosti (Games-Howell test, $p = 0,05$)/values with the asterisk are significantly different from control value (Games-Howell test, $p = 0,05$)

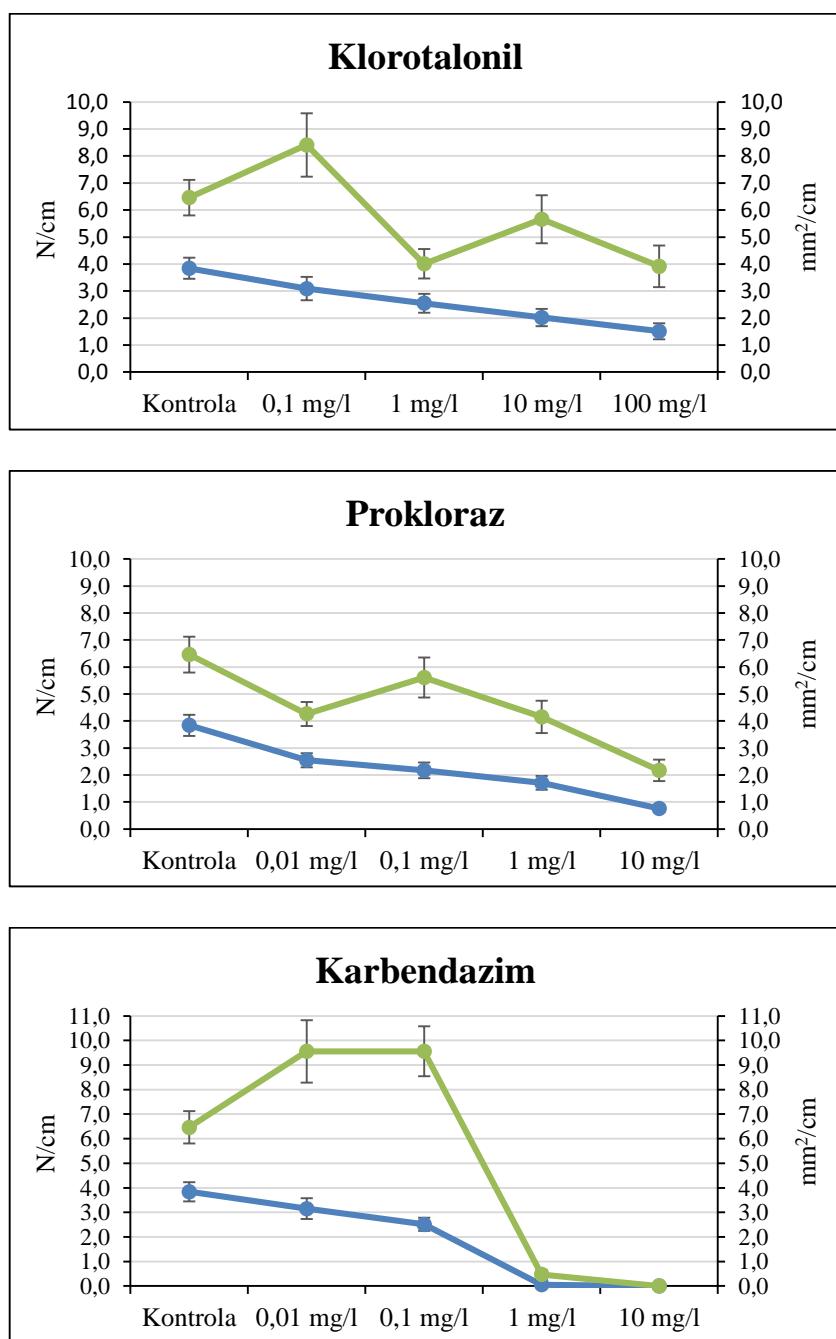
Tiram in klorotalonil sta v primerjavi s kontrolnimi peclji značilno ($p < 0,05$) zmanjšala število razvitih apotecijev pri koncentracijah 10 in 100 mg/l, kaptan pa le pri slednji, torej največji testirani koncentraciji (100 mg/l). Število razvitih trosišč je tudi po teh obdelavah precej preseglo 1 apotecij/cm peclja, pri kaptanu pa je to število po vseh obdelavah preseglo 2 apotecija/cm (preglednica 9).

Če število razvitih trosišč pomnožimo s povprečno površino trosovnic apotecijev, ki so se razvili po posameznih obdelavah, ugotovimo, da je so bile testirane aktivne snovi še nekoliko manj učinkovite. Primerjava aktivnih snovi na treh koncentracijah (0,1; 1 in 10 mg/l) skupaj je sicer ponovno pokazala značilne razlike v učinkovitosti ($F = 4,54$; $p < 0,001$). Razlike med koncentracijami pa smo ponovno odkrili le pri nekaterih aktivnih snoveh (preglednica 10).



Slika 22: Število razvitih apotecijev (modra) in površina trosovnic apotecijev (zelena) na kontrolnih pecljih in na pecljih, ki smo jih obdelovali z različnimi koncentracijami kaptana (zgoraj) in tirama (spodaj). Prikazana so povprečja in standardne napake

Figure 22: Number of developed apothecia (blue) and disc area of apothecia (green) on control petioles and on petioles treated with different concentrations of captan (up) and thiram (down). Means and standard errors are shown



Slika 23: Število razvitih apotecijev (modra) ter povprečna površina trosovnic apotecijev (zelena) na kontrolnih pecljih in na pecljih, ki smo jih obdelovali z različnimi koncentracijami klorotalonila (zgoraj), prokloraza (sredina) in karbendazima (spodaj). Prikazana so povprečja in standardne napake

Figure 23: Number of developed apothecia (blue) and average disc area of apothecia (green) on control petioles and on petioles treated with different concentrations of clorothalonil (up), prochloraz (middle) and carbendazim (down). Means and standard errors are shown

Povprečna površina trosovnic na kontrolnih pecljih je tako bila $6,46 \text{ mm}^2$ na cm peclja in le obdelave z 1 oziroma 10 mg/l karbendazima, z 10 mg/l prokloraza in 100 mg/l tirama so značilno ($p < 0,05$) zmanjšale površino razvith trosovnic glive (preglednica 10). Obdelave z manjšimi koncentracijami karbendazima (0,01 in 0,1 mg/l) in klorotalonila (0,1 mg/l) so povečale povprečno površino trosovnic glive (sliki 23 in 24). Rahlo povečanje smo ugotovili tudi po obdelavi s kaptanom pri koncentraciji 10 mg/l (slika 22). V primeru klorotalonila je ta površina presegla $8 \text{ mm}^2/\text{cm}$, v primeru karbendazima pa celo $9,5 \text{ mm}^2/\text{cm}$ (preglednica 10). Ta povečanja površine trosovnic v primerjavi s kontrolnimi peclji zaradi velikih razlik med posameznimi peclji iste obdelave niso bila značilna.



Slika 24: Razlika v številu in velikosti oblikovanih apotecijev na jesenovih pecljih, ki smo jih obdelovali z destilirano vodo (levo) oziroma z različnimi koncentracijami karbendazima: 0,1 mg/l (sredina) in 1 mg/l (desno)

Figure 24: Difference in number and in size of developed apothecia on ash petioles treated with distilled water (left) and different concentrations of carbendazim: 0.1 mg/l (middle) and 1 mg/l (right)

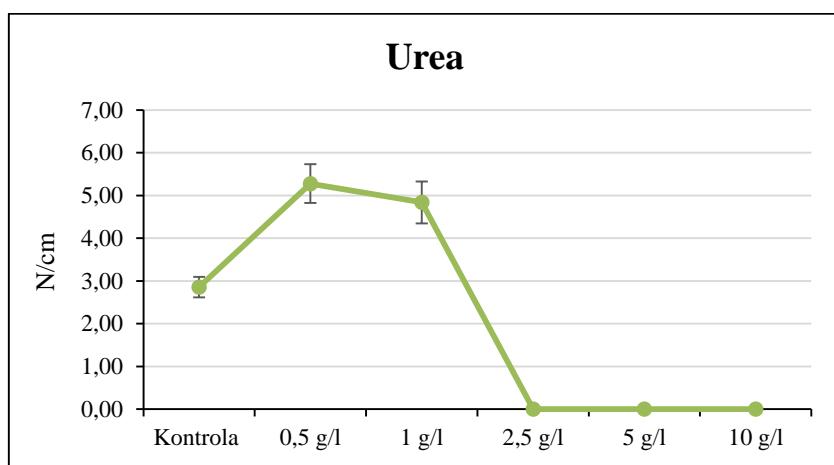
4.2.5 Vpliv uree na oblikovanje apotecijev glive *H. pseudoalbidus*

Razlike med obdelavami z različnimi koncentracijami uree so bile značilno različne ($p < 0,001$). Na kontrolnih pecljih, ki so bili obdelani s sterilno destilirano vodo in so bili po 35 dneh premeščeni v prostor z nižjo temperaturo, se je v povprečju razvilo 2,86 apotecija/cm. Na pecljih, ki smo jih obdelovali z manjšima koncentracijama uree, se je v primerjavi s kontrolnimi peclji razvilo značilno več trosišč ($p < 0,05$). Po obdelavah s koncentracijama 0,5 in 1 g/l se je tako v povprečju razvilo 5,28 oziroma 4,84 apotecija/cm (slika 26). Apoteciji se na pecljih, ki smo jih namakali v raztopinah s koncentracijami 2,5; 5 in 10 g/l, niso razvili. Te peclje so približno po dveh do treh tednih začele preraščati druge glive (slika 25). Nekatere med njimi nam je uspelo izolirati v čiste kulture. Molekularne analize izolatov so pokazale, da je šlo najpogosteje za vrste iz rodu *Fusarium* (izolirali smo pet različnih vrst), izolirali pa smo tudi glivi iz rodov *Chaetomium* in *Graphium*. Poleg teh gliv smo na pecljih, ki so bili obdelani z večjimi koncentracijami uree, pogosto odkrili tudi predstavnice koprinoidnih gliv (slika 25). Na kontrolnih pecljih, ki so bili vseskozi shranjeni v prostoru s temperaturami med 23 in 25 °C, se je v povprečju razvilo le 0,21 apotecijev/cm.



Slika 25: Peclje, obdelane z večjimi koncentracijami uree, so prerasle druge glive. Med njimi so bile pogosto tudi koprinoidne glive

Figure 25: Petioles, treated with higher urea concentrations, were overgrown with other fungi. Among them also coprinoid fungi were often found



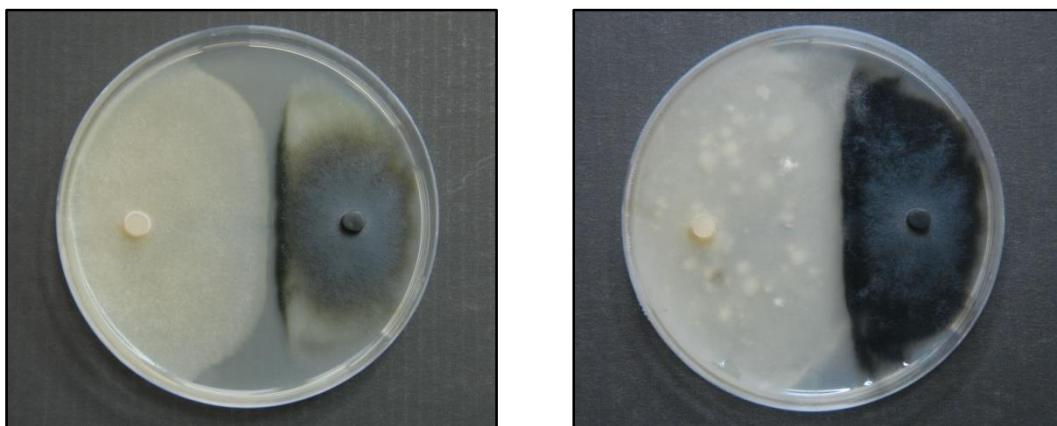
Slika 26: Število razvitih apotecijev na kontrolnih pecljih ter na pecljih, ki so bili obdelani z različnimi koncentracijami uree. Prikazana so povprečja in standardne napake

Figure 26: Number of developed apothecia on control petioles and on petioles treated with different concentration of urea. Means and standard errors are shown

4.3 INTERAKCIJE MED GLIVO *C. fraxinea* IN DRUGIMI GLIVAMI, KI SMO JIH IZOLIRALI IZ JESENOVIH TKIV

Na podlagi popisov dvojnih kultur, v katerih smo glivo *C. fraxinea* gojili skupaj z drugimi glivami, ki smo jih izolirali iz jesenovih tkiv, smo te razdelili v 6 skupin:

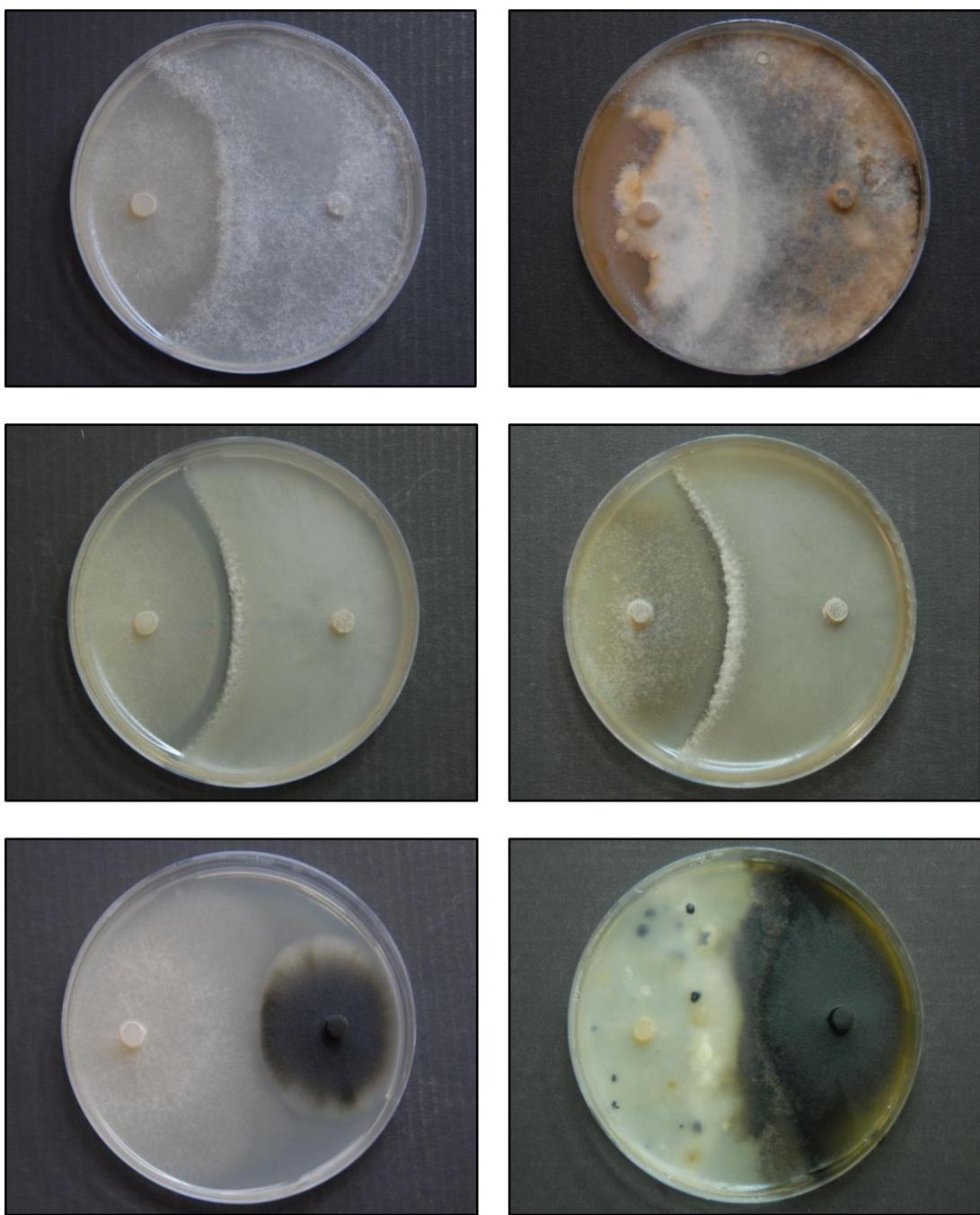
1. Kolonije so se popolnoma približale druga drugi in se nato ustavile. V to skupino smo uvrstili glivi *Phoma* sp. in *Botryosphaeria dothidea*. Kolonije slednje so se sprva ustavile nekaj mm stran od kolonij glive *C. fraxinea*, kasneje pa sta se glivi vendarle popolnoma približali in obstali (slika 27).



Slika 27: Koloniji gliv *C. fraxinea* in *Botryosphaeria dothidea* po treh tednih (levo) in treh mesecih (desno). Gliva *C. fraxinea* je vedno na levi strani petrijevke

Figure 27: *C. fraxinea* and *Botryosphaeria dothidea* colonies after three weeks (left) and three months (right). Fungus *C. fraxinea* is always on the left side of the petri dish

2. Kolonije so se popolnoma približale druga drugi, nato pa so druge glive začele preraščati oziroma vraščati v kolonijo glive *C. fraxinea*. Kolonije glive *C. fraxinea* so manj intenzivno preraščale glive *Hypoxyylon howeanum*, *Cadophora luteo olivacea*, *Phaeoacremonium* sp. in *Leptospora rubella*. Nekoliko bolj intenzivno vraščanje oziroma preraščanje kolonij glive *C. fraxinea* so prikazale glive *Alternaria alternata*, *Lophiostoma corticola*, *Coniochaeta* sp., *Hyalodendriella* sp. in *Leptosphaeria* sp. Glive *Phomopsis* sp. 1, *Phomopsis* sp. 2, in *Diaporthe viticola* pa so kolonije glive *C. fraxinea* v treh mesecih skoraj v celoti oziroma v celoti prerasle. Podobno kot pri prejšnji skupini so se kolonije gliv *Leptosphaeria* sp., *Hyalodendriella* sp. in *D. viticola* sprva zaustavile nekaj mm od kolonij glive *C. fraxinea*, kasneje pa so se približale in se začele vraščati oziroma jih preraščati.



Slika 28: Dvojne kulture glive *C. fraxinea* in gliv *Phomopsis* sp.1 (zgoraj), *Diaporthe viticola* (sredina) in *Coniophora* sp. (spodaj). Slike na levi strani so bile posnete po treh tednih rasti, slike na desni strani pa po treh mesecih. Gliva *C. fraxinea* je vedno na levi strani petrijevke

Figure 28: Dual cultures of fungus *C. fraxinea* and fungi *Phomopsis* sp. 1 (up), *Diaporthe viticola* (middle) and *Coniophora* sp. (down). Left pictures were taken after three weeks of growth and pictures on the right after three months. Fungus *C. fraxinea* is always on the left side of the petri dish

Zanimiv je predvsem primer glive *D. viticola*, kjer na videz preraščanja sploh ni bilo (slika 28), vendar smo nasprotno dokazali s precepljanjem na sveža gojišča. Ko smo koščke gojišča z mest vraščanja oziroma preraščanja kolonij prenesli na nova gojišča,

se iz njih nikoli ni razrasla gliva *C. fraxinea*, temveč vedno samo druga gliva, ki ji je v določeni dvojni kulturi rasla nasproti. Glivo *C. fraxinea* smo sicer uspešno izolirali iz predelov kolonij, ki niso bili preraščeni z drugimi glivami. Izjema so bile le kolonije, ki so rasle skupaj z glivo *Hypoxyton howeanum*.

3. Kolonije so se popolnoma približale druga drugi, nato pa je gliva *C. fraxinea* začela počasi vraščati v kolonijo druge glive. To smo opazili v dvojnih kulturah z glivo *Bjerkandera adusta* (slika 29). Preraščanje je bilo neizrazito in opazno šele ob drugem popisu (po treh mesecih).



Slika 29: Dvojna kultura gliv *C. fraxinea* in *Bjerkandera adusta*. Po treh mesecih rasti je bilo mogoče opaziti, da *C. fraxinea* (na levi strani petrijevke) počasi prerašča kolonijo glive *B. adusta*

Figure 29: Dual culture of fungi *C. fraxinea* and *Bjerkandera adusta*. After three months of growth we noticed that *C. fraxinea* (on the left side of the petri dish) was slowly overgrowing colony of *B. adusta*

4. Kolonije so se popolnoma približale druga drugi, nato pa sta obe glivi začeli s preraščanjem oziroma vraščanjem v drugo. Obojestransko vraščanje pa smo opazili v dvojnih kulturah z glivo *Biscogniauxia nummularia*. Pri tem je *C. fraxinea* vraščala v drugo kolonijo globlje v gojišču, medtem ko jo je gliva *B. nummularia* preraščala na površju (slika 31).
5. Kolonije so se zaustavile na določeni razdalji druga od druge in oblikovale t. i. inhibicijsko cono (slika 30). V to skupino smo uvrstili glivi *Epicoccum nigrum* in *Fusarium* sp.
6. V zadnjo skupino smo uvrstili glivo *Hypocrea* sp., ki je zelo hitro popolnoma prerasla kolonijo glive *C. fraxinea* (slika 32).



Slika 30: Inhibicijska cona med glivama *C. fraxinea* in *Epiccocum nigrum* (levo) ter *C. fraxinea* in *Fusarium* sp. (desno) po treh mesecih rasti. Gliva *C. fraxinea* je vedno na levi strani petrijevke

Figure 30: Inhibition zone between fungi *C. fraxinea* and *Epiccocum nigrum* (left) and between *C. fraxinea* and *Fusarium* sp. (right). Fungus *C. fraxinea* is always on the left side of the petri dish



Slika 31: Gliva *Biscogniauxia nummularia* je kolonijo glive *C. fraxinea* (na levi strani petrijevke) prerasla na površini gojišča in po straneh petrijevke. *C. fraxinea* pa je v kolonijo glive *B. nummularia* vrasla po sredini, in sicer globlje v gojišču

Figure 30: Fungus *Biscogniauxia nummularia* overgrew the *C. fraxinea* colony (on the left side of the petri dish) on the surface of growth media and by the sides of the petri dish. The latter grew into *B. nummularia* colony deeper in the growth media in the central part of the petri dish



Slika 32: Gliva *Hypocrea* sp. je zelo hitro popolnoma prerasla kolonijo glive *C. fraxinea* na levi strani petrijevke

Figure 32: Fungus *Hypocrea* sp. very quickly completely overgrew *C. fraxinea* colony on the left side of the petri dish

4.4 INDIVIDUALNA ODPORNOST POLJSKEGA JESENA (*Fraxinus angustifolia*)

4.3.1 Popisi poškodovanosti krošenj

Popisi so pokazali značilne razlike v poškodovanosti krošnje med različnimi kloni vrste *F. angustifolia* ($F = 48,66$; $p < 0,001$). Povprečni delež poškodovane krošnje posameznih klonov je v letu 2009 variiral med 13,2 in 53,4 %, v letu 2010 med 13,5 in 63,8 %, v letu 2011 med 16,5 in 78,8 % in v letu 2012 med 14,2 in 83,8 % (preglednica 11). Najbolj značilne razlike smo ugotovili med trojico najbolj poškodovanih klonov (kloni št. 21, 26 in 52) in vsemi drugimi kloni (sliki 32 in 33). Tako je npr. povprečni delež poškodovane krošnje pri klonih št. 21, 26 in 52 v letu 2012 znašal 71,2, 83,8 oziroma 71,5 %, medtem ko je bil ta delež pri vseh drugih klonih manjši od 40 %, pri petih najbolj vitalnih pa celo manjši od 20 %.

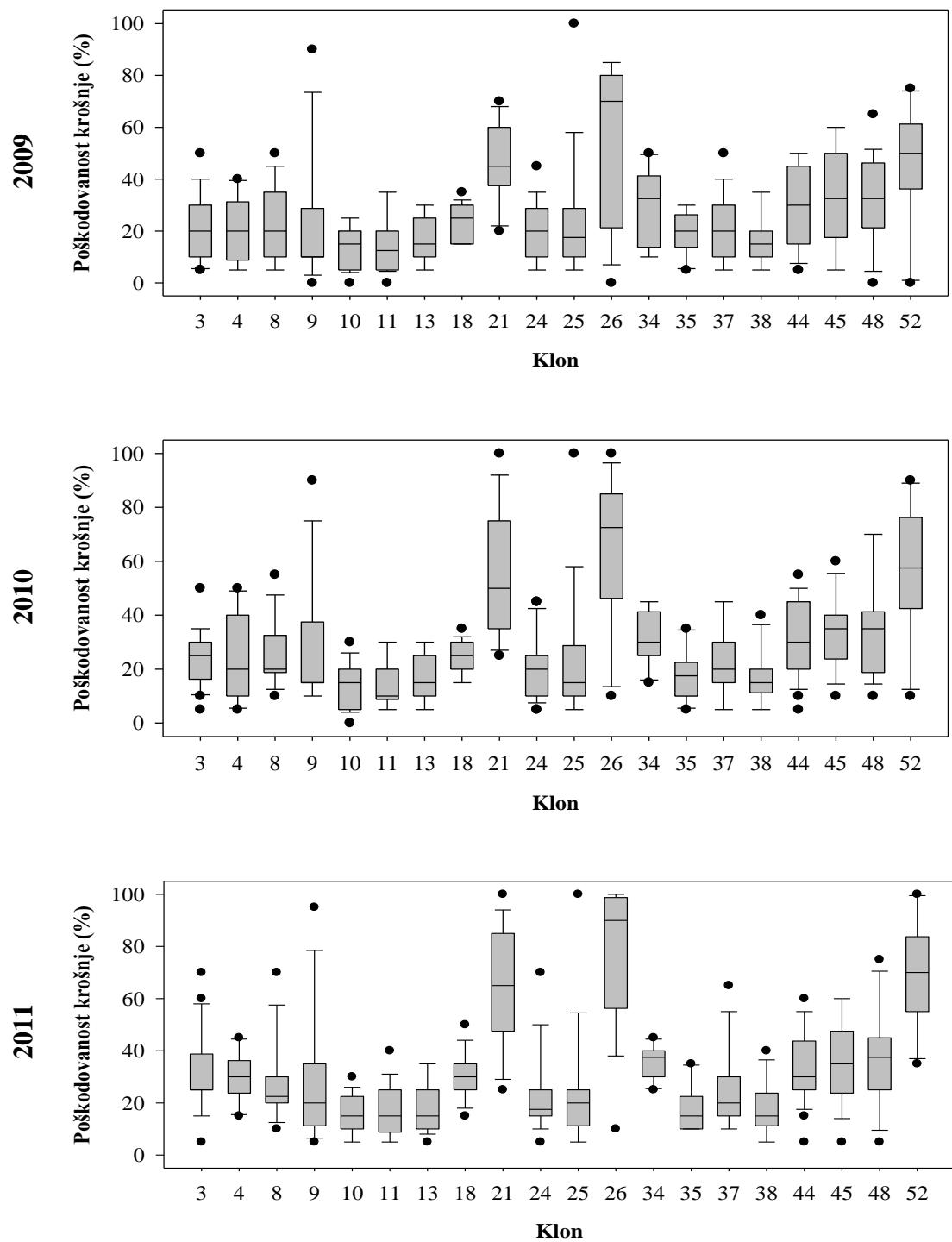
Značilne razlike v poškodovanosti krošnje smo ugotovili tudi med različnimi leti ($F = 16,86$; $p < 0,001$). Povprečni delež poškodovane krošnje vseh 314 dreves (vseh 20 klonov) je v letu 2009 znašal 25,6 %, nato pa se je v letih 2010 in 2011 povzpel na 28,1 % oziroma 32,0 %. Ta delež se nato od leta 2011 do leta 2012 ni bistveno spremenil in je ostal 32,0 % (preglednica 11). Analiza podatkov je pokazala tudi značilno interakcijo med dejavnikoma klon in leto ($F = 3,98$; $p < 0,001$). To se kaže v različnih trendih naraščanja oziroma zmanjševanja poškodovanosti posameznih klonov. Tako se je povprečni delež poškodovane krošnje pri sedmih klonih vsako leto povečal (tudi med temi kloni je opazna razlika v hitrosti povečevanja poškodovanosti), klon številka 35 pa je bil z vsakim popisom ocenjen nekoliko bolje. Pri drugih 12 klonih pa se je povprečna poškodovanost krošnje od leta 2009 do leta 2011 povečevala, v obdobju med zadnjima dvema popisoma pa se je poškodovanost krošnje nekoliko zmanjšala (preglednica 11). Če primerjamo prvi popis poškodovanosti (2009) z zadnjim (2012), ugotovimo, da se je povprečni delež poškodovane krošnje pri 13 klonih povečal za manj kot 5 % (kot smo že omenili, se je pri klonu št. 35 celo nekoliko zmanjšal). Izstopajo ponovno kloni št. 21, 26 in 52, katerih delež poškodovane krošnje se je v tem času povečal za 25 do 30 %.

Od vseh 314 dreves, ki smo jih vključili v analizo, je bilo v letu 2009 mrtvo le eno. V letu 2010 smo odkrili tri odmrle osebke, leta 2011 sedem, v času zadnjega popisa leta 2012 pa je bilo odmrlih dreves že 15. Na odmrlih osebkah smo poleg simptomov jesenovega ožiga večinoma odkrili simptome okužbe z glivami iz rodu *Armillaria* in/ali znake napada jesenovih podlubnikov (Scolytinae). Leta 2009 šest dreves ni kazalo simptomov jesenovega ožiga oziroma je bil delež poškodovane krošnje manjši od 5 %. Leta 2010 je bilo tako ocenjeno drevo le eno, v letih 2011 in 2012 pa tako zdravih osebkov nismo več odkrili.

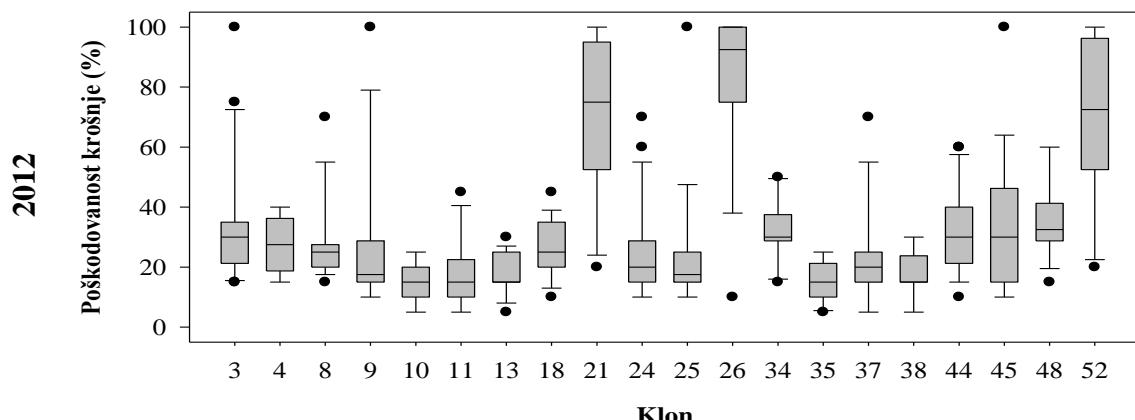
Preglednica 11: Delež poškodovane krošnje 20 različnih klonov vrste *Fraxinus angustifolia* v letih 2009, 2010, 2011 in 2012 ter razlika v deležu poškodovane krošnje posameznih klonov med prvim in zadnjim popisom poškodovanosti. Prikazana so povprečja in standardne napake

*Table 11: Damaged crown share of 20 different *Fraxinus angustifolia* clones in years 2009, 2010, 2011 and 2012 as well as difference in damaged crown share of individual clones between the first and the last crown damage assessment. Means and standard errors are shown*

Klon/ Clone	Št. Nr. of ramets	Delež poškodovane krošnje (%)/Damaged crown share (%)				
		2009	2010	2011	2012	2012–2009
3	19	22,4 ± 3,0	24,2 ± 2,4	30,8 ± 3,4	35,5 ± 4,8	13,2 ± 3,4
4	10	20,0 ± 3,9	23,5 ± 4,9	30,5 ± 2,8	27,5 ± 2,9	7,5 ± 4,4
8	14	21,8 ± 3,6	25,7 ± 3,3	27,1 ± 4,0	27,5 ± 3,7	5,7 ± 2,3
9	12	21,3 ± 6,9	26,3 ± 6,5	27,1 ± 6,9	25,8 ± 7,0	4,6 ± 2,3
10	17	13,2 ± 1,9	13,5 ± 2,1	16,5 ± 1,9	14,2 ± 1,6	0,9 ± 1,2
11	18	13,6 ± 2,3	13,9 ± 1,9	16,9 ± 2,3	18,1 ± 2,7	4,4 ± 2,3
13	15	16,7 ± 2,2	17,0 ± 2,1	18,3 ± 2,4	18,0 ± 1,8	1,3 ± 2,2
18	15	23,3 ± 1,7	23,7 ± 1,6	30,3 ± 2,3	26,3 ± 2,3	3,0 ± 2,4
21	13	46,2 ± 4,2	54,6 ± 6,2	63,1 ± 6,1	71,2 ± 7,4	25,0 ± 6,0
24	24	20,0 ± 2,2	20,4 ± 2,4	23,3 ± 3,1	25,4 ± 3,2	5,4 ± 3,2
25	16	22,8 ± 5,8	23,1 ± 5,8	23,8 ± 5,5	22,8 ± 5,3	0,0 ± 1,9
26	16	53,4 ± 7,6	63,8 ± 6,9	78,8 ± 6,4	83,8 ± 6,0	30,3 ± 6,1
34	10	30,0 ± 4,6	31,5 ± 3,1	36,0 ± 1,9	32,5 ± 3,1	2,5 ± 4,0
35	10	19,0 ± 2,6	18,0 ± 2,9	18,0 ± 2,7	15,5 ± 2,3	-3,5 ± 3,0
37	19	21,6 ± 2,9	23,2 ± 2,7	24,7 ± 3,5	22,6 ± 3,7	1,1 ± 2,7
38	16	16,6 ± 2,6	17,8 ± 2,5	18,1 ± 2,6	16,9 ± 2,1	0,3 ± 1,3
44	24	30,0 ± 3,2	31,0 ± 2,9	33,8 ± 2,7	32,7 ± 3,0	2,7 ± 2,6
45	18	32,5 ± 4,5	34,2 ± 3,3	36,1 ± 3,7	35,0 ± 5,2	2,5 ± 4,1
48	18	31,4 ± 4,2	34,7 ± 4,1	36,4 ± 4,3	35,3 ± 2,9	3,9 ± 3,7
52	10	46,0 ± 7,4	56,0 ± 7,4	69,0 ± 6,3	71,5 ± 8,2	25,5 ± 9,4
Skupaj/ Total	314	25,6 ± 1,1	28,1 ± 1,1	32,0 ± 1,3	32,0 ± 1,4	6,4 ± 0,9



Slika 33: Delež poškodovane krošnje 20 različnih klonov vrste *F. angustifolia* v letih 2009, 2010 in 2011
 Figure 33: Damaged crown share of 20 different *F. angustifolia* clones in years 2009, 2010 and 2011

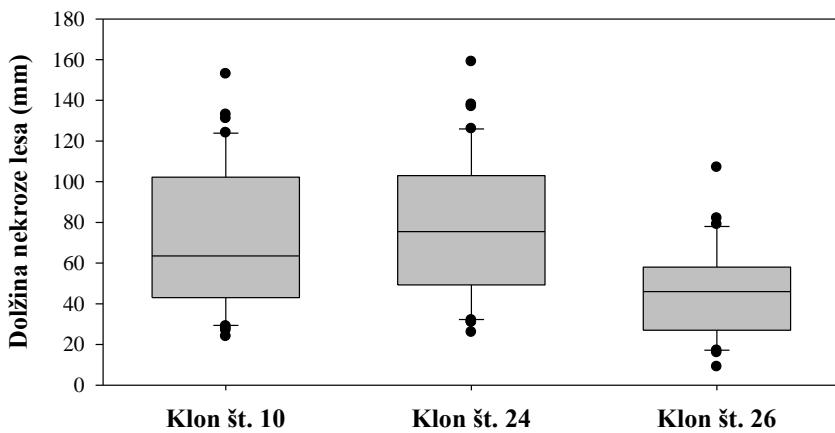


Slika 34: Delež poškodovane krošnje 20 različnih klonov vrste *F. angustifolia* leta 2012

Figure 34: Damaged crown share of 20 different *F. angustifolia* clones in year 2012

4.3.2 Inokulacije glive *C. fraxinea* v veje izbranih klonov

Tudi v poskusu z inokulacijami glive v vejice različnih klonov smo ugotovili značilne razlike med kloni. Med tremi izbranimi kloni smo namreč odkrili značilne razlike v dolžini nekroz ($F = 19,15$; $p < 0,001$), ki jih je povzročila gliva *C. fraxinea* (slika 35).

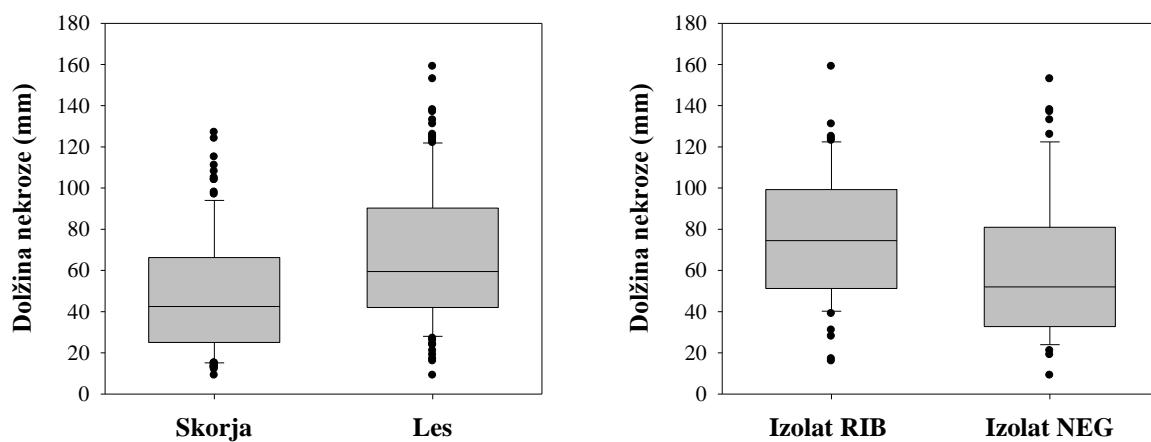


Slika 35: Dolžina nekroz lesa, ki jih je povzročila gliva *C. fraxinea* po inokulaciji v vejice treh različnih klonov vrste *F. angustifolia*

Figure 35: Wood necroses lenght caused by *C. fraxinea* after inoculation into twigs of three different *F. angustifolia* clones

Dolžine nekroz na vejicah klona številka 26 so bile značilno krajše od nekroz na vejicah klona številka 10 ($p = 0,03$) in tudi značilno krajše od nekroz na vejicah klona številka 24 (p

= 0,02). Razlik v dolžini nekroz med klonoma številka 10 in 24 nismo odkrili ($p = 0,77$). Povprečna dolžina nekroze je v lesu inokuliranih vejic klena številka 10 merila 73,6 mm, na klonu števila 24 so nekroze lesa v povprečju merile 78,3 mm, na klonu številka 26 pa 45,7 mm. Nekroze, ki jih je povzročila gliva *C. fraxinea* so bile sicer v lesu značilno ($F = 21,57$; $p < 0,001$) daljše od nekroz skorje (slika 36). Če upoštevamo vse tri inokulirane klone, so nekroze skorje v povprečju merile 49,4 mm, nekroze lesa pa 67,7 mm.



Slika 36: Razlike v dolžini nekroz skorje in lesa (levo) in razlike v dolžini nekroz lesa, ki sta jih povzročila dva različna izolata glive *C. fraxinea* (desno)

Figure 36: Differences in length of bark and wood necroses (left) and differences in length of wood necroses caused by two distinct *C. fraxinea* isolates (right)

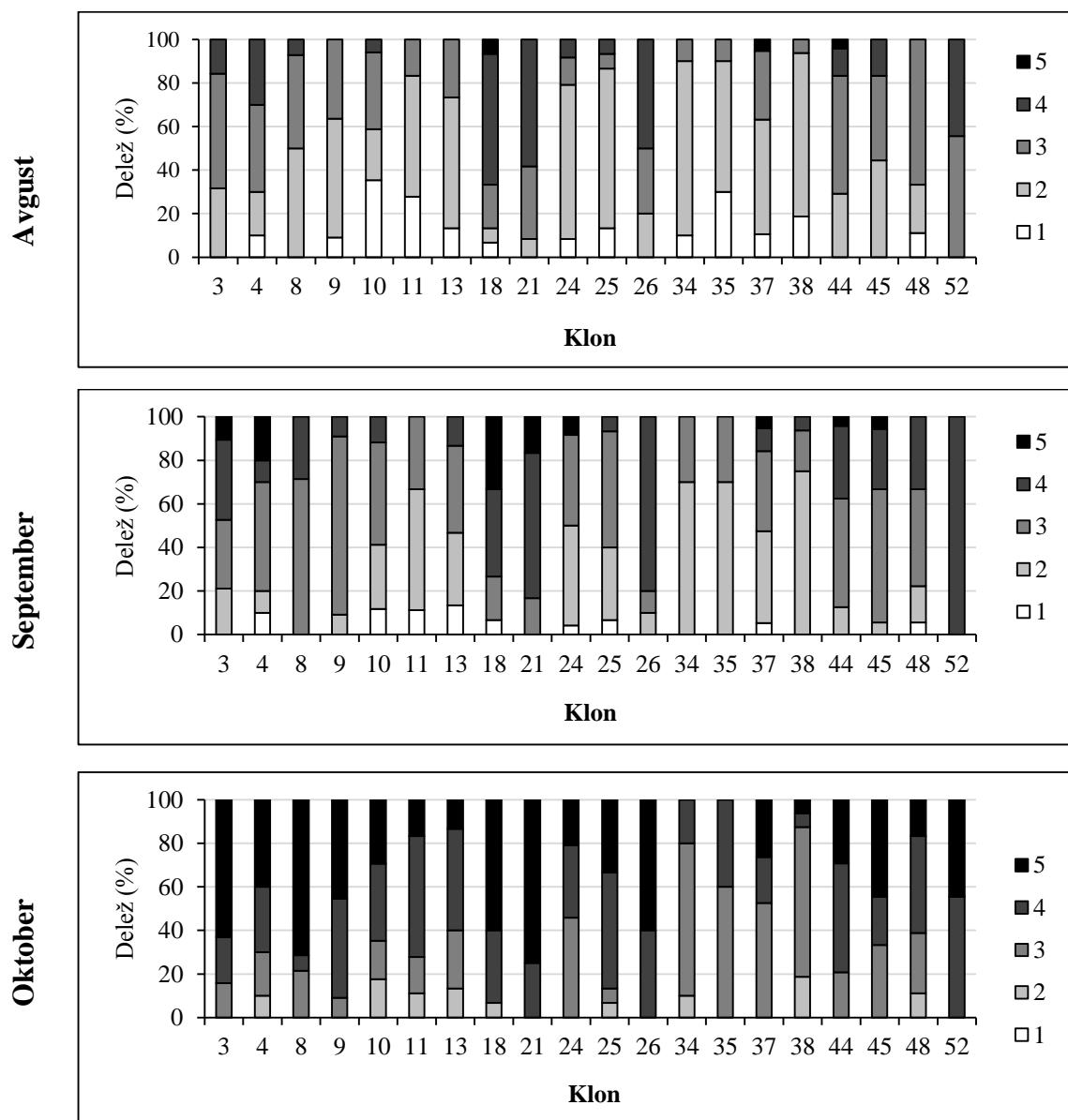
Značilne razlike smo ugotovili tudi med dvema uporabljenima izolatoma glive *C. fraxinea*. Nekroze lesa, ki jih je povzročil izolat RIB, so v povprečju merile 75,4 mm in so bile značilno daljše ($F = 14,57$; $p < 0,001$) od nekroz lesa, ki jih je povzročil izolat NEG (slika 36). Te so v povprečju merile 60,8 mm.

Uspešnost reisolace glive *C. fraxinea* iz inokuliranih vejic je bila 93,3 %, saj smo glivo uspešno reisolirali iz 28 od 30 naključno izbranih vejic. Nekroz skorje oziroma lesa na vejicah, ki smo jih inokulirali s sterilním sladním agarjem (2 % MEA), nismo odkrili. Glive *C. fraxinea* nam tako tudi ni uspelo izolovat z nobene od šestih naključno izbraných kontrolních vejic.

4.3.3 Popis deleža odpadlega listja ter stopnje spomladanske razvitosti brstov

Razlike med posameznimi osebkami so bile opazne že na terenu. Tako je iz nekaterih dreves listje v celoti odpadlo že avgusta, nekatera pa so bila še oktobra popolnoma olistana. Analiza rezultatov je pokazala, da razlike obstajajo tudi na ravni klonov ($p < 0,001$). Razlike v deležu

predčasno odpadlega listja med kloni so bile opazne v vseh treh mesecih, v katerih so potekali popisi. Avgusta in septembra so najbolj izstopali kloni številka 18, 21, 26 in 52, ki so najprej ostali brez listja (slika 37). Oktobra so se razlike med kloni zmanjšale, nekoliko sta izstopala le kloni 34 in 38, ki sta ohranila največji delež listja (slika 37). Nekatera drevesa, ki so poleti prva ostala brez listja, so do zadnjega popisa (12. oktober) razvila novo listje. Pogosto smo tudi na tem listju odkrili značilne nekroze, ki jih povzroča gliva *C. fraxinea* (slika 38).



Slika 37: Delež osebkov posameznega klonu po petih različnih stopnjah odpadanja listja avgusta, septembra in oktobra 2011

Figure 37: Share of ramets of distinct clone by five different leaf shedding rates in August, September and October 2011



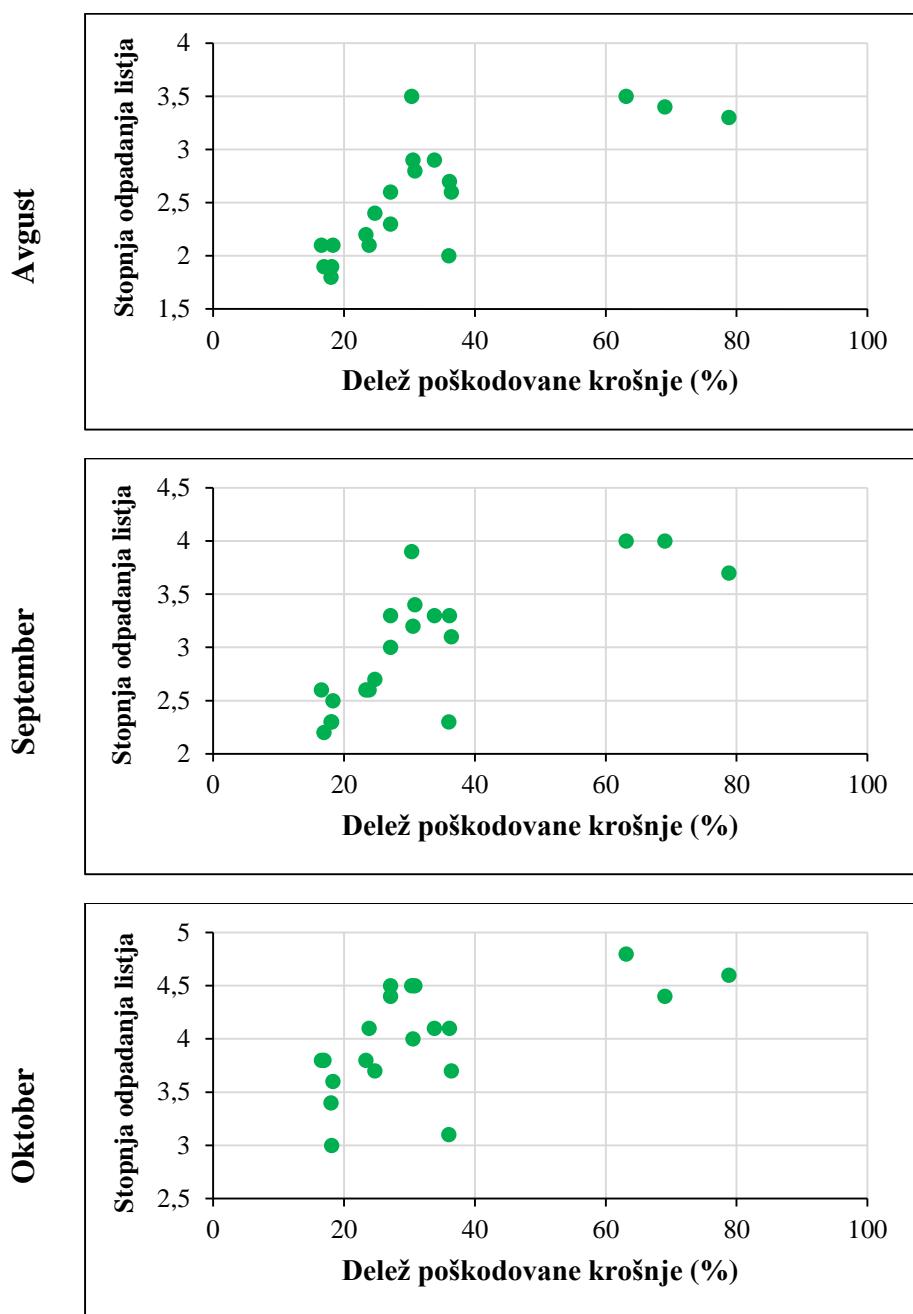
Slika 38: Novo razvito listje na enem izmed dreves, ki je že avgusta odvrglo večino listja (zgoraj), je v oktobru kazalo tipične nekroze jesenovega ožiga (desno)

Figure 38: Newly developed leaves on ramet, which lost most of its leaves already in August (up), in October showed typical ash dieback necroses (right)



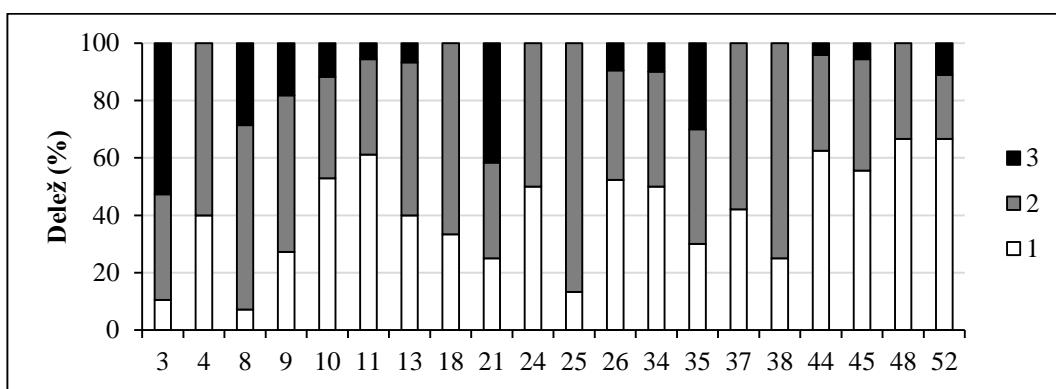
Ko smo primerjali rezultate popisa poškodovanosti krošnje z rezultati popisa odpadanja listja, smo avgusta ($p < 0,001$; $r = 0,75$) in septembra ($p < 0,001$; $r = 0,77$) odkrili zmerno do močno pozitivno korelacijo med povprečno poškodovanostjo krošnje in povprečno stopnjo odpadanja listja posameznih klonov (slika 39). Oktobra je ta korelacija zaradi »naravnega« jesenskega odpadanja listja postala šibkejša ($p = 0,02$; $r = 0,52$).

Kloni so se med seboj značilno razlikovali tudi po razvitosti brstov na dan 26. aprila 2012 ($p < 0,001$). S post hoc testom smo ugotovili, da značilne razlike obstajajo samo med klonom št. 3, ki je imel v povprečju najbolj razvite brste oziroma najdaljše nove poganjke in liste, in kloni št. 11, 24, 44 in 48, ki so imeli velik delež brstov še popolnoma zaprtih (slika 40). Primerjava povprečne razvitosti brstov z rezultati popisa poškodovanosti krošnje je pokazala, da je korelacija med ocenama zelo šibka ($p = 0,30$; $r = 0,24$) (slika 41).

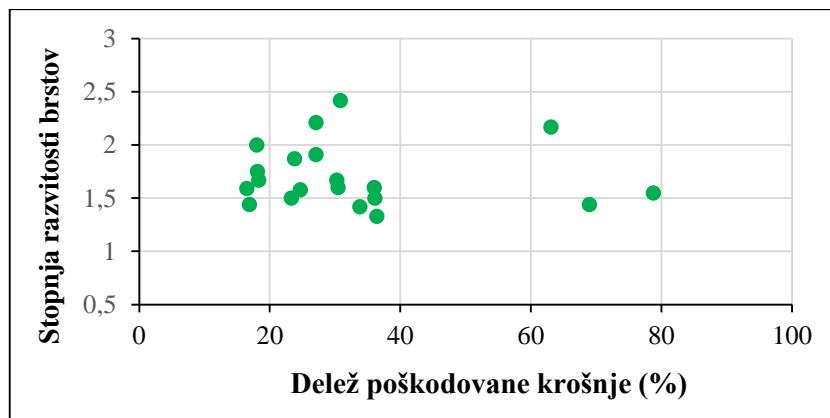


Slika 39: Korelacija med povprečnim deležem poškodovane krošnje julija 2011 in povprečno stopnjo odpadanja listja posameznih klonov avgusta, septembra in oktobra 2011

Figure 39: Correlation between mean crown damage share in July 2011 and mean leaf shedding rate of clones in August, September and October 2011



Slika 40: Delež osebkov posameznega klonu po treh različnih stopnjah razvitosti brstov na dan 26. april 2012
 Figure 40: Share of ramets of distinct clone by three different bud development rates on the 26th of April 2012



Slika 41: Korelacija med povprečnim deležem poškodovane krošnje julija 2011 in povprečno stopnjo razvitosti brstov posameznih klonov na dan 26. april 2012
 Figure 41: Correlation between mean crown damage in July 2011 and mean bud development rate of particular clone on the 26th of April 2012

4.3.4 Pregled koreničnikov izbranih klonov

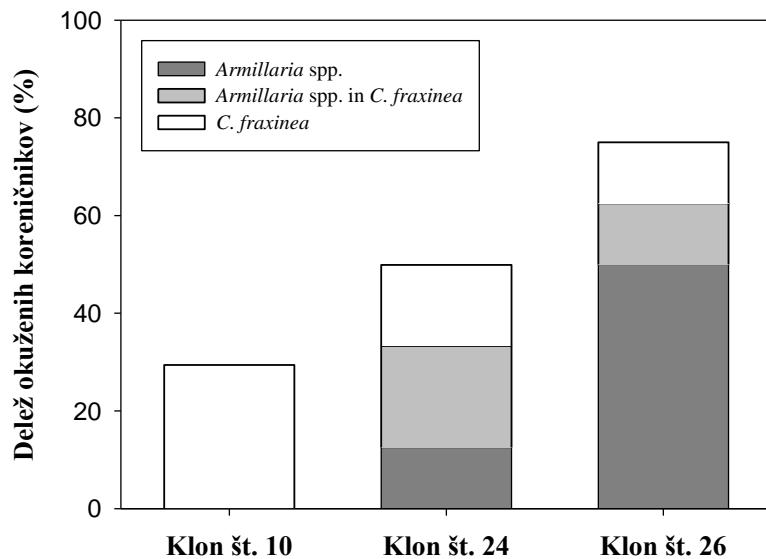
Poškodovanost koreničnikov treh različnih klonov je bila zelo različna. Poleg značilnih micelijskih pahljačic (slika 42 levo) in rizomorfov, ki so značilni za okužbe z *Armillaria* spp., smo pogosto odkrili tudi nekroze (slika 42 desno), ki niso značilne za okužbe z omenjenimi glivami. Izolacije gliv v čiste kulture iz štirih odvzetih vzorcev so pokazale, da je povzročiteljica teh nekroz gliva *C. fraxinea*.



Slika 42: Tipične micelijske pahljačice gliv iz rodu *Armillaria* (levo) in nekroza, ki jo je na koreničniku povzročila gliva *C. fraxinea* (desno)

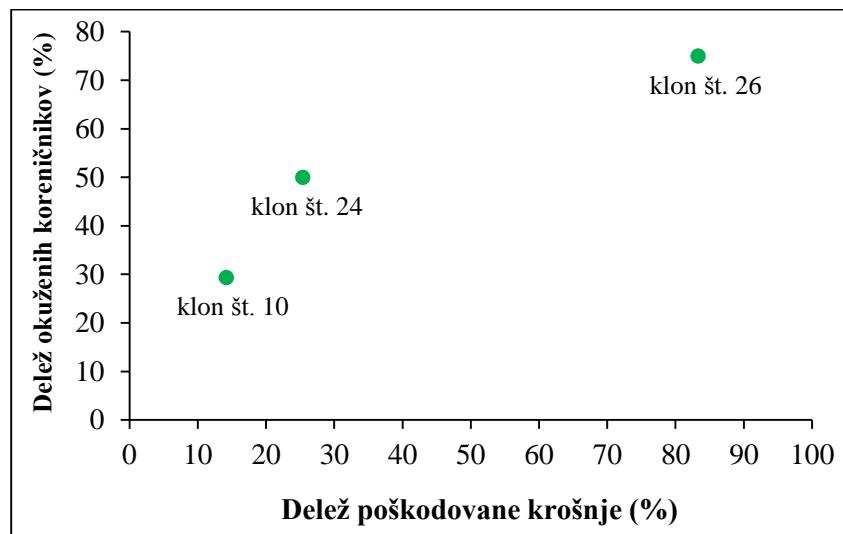
Figure 42: Typical mycelia fans produced by *Armillaria* fungi (left) and root collar necrosis produced by *C. fraxinea* (right)

Na drevesih klona št. 10 nismo odkrili okužb z *Armillaria* spp., smo pa na petih (29,4 %) koreničnikih tega klona odkrili nekroze, ki jih je povzročila *C. fraxinea* (slika 43). Na treh (12,5 %) koreničnikih klona št. 24 smo odkrili samo okužbe z *Armillaria* spp., na petih (20,8 %) so bile prisotne tako okužbe z *Armillaria* spp. kot tudi okužbe z *C. fraxinea*, na štirih (16,7 %) pa samo nekroze, ki jih je povzročila *C. fraxinea*. Skupaj je bilo torej okuženih 50 % koreničnikov vseh osebkov klona št. 24. Še večji delež okuženih koreničnikov (75 %) pa smo odkrili pri klonu št. 26. Na večini osebkov tega klona smo odkrili samo okužbe z mraznicami (50 %), dva koreničnika (12,5 %) sta bila okužena z mraznicami in z glivo *C. fraxinea*, na dveh (12,5 %) pa smo odkrili samo nekroze, ki jih je povzročila gliva *C. fraxinea*. Če upoštevamo popise poškodovanosti krošnje teh treh klonov, lahko ugotovimo, da je stopnja okužbe koreničnikov sorazmerna povprečni poškodovanosti krošnje (slika 44).



Slika 43: Okužbe koreničnikov treh izbranih klonov vrste *F. angustifolia* z glivami iz rodu *Armillaria* spp. in glivo *C. fraxinea*

Figure 43: *Armillaria* spp. and *C. fraxinea* root collar infections of three selected *F. angustifolia* clones

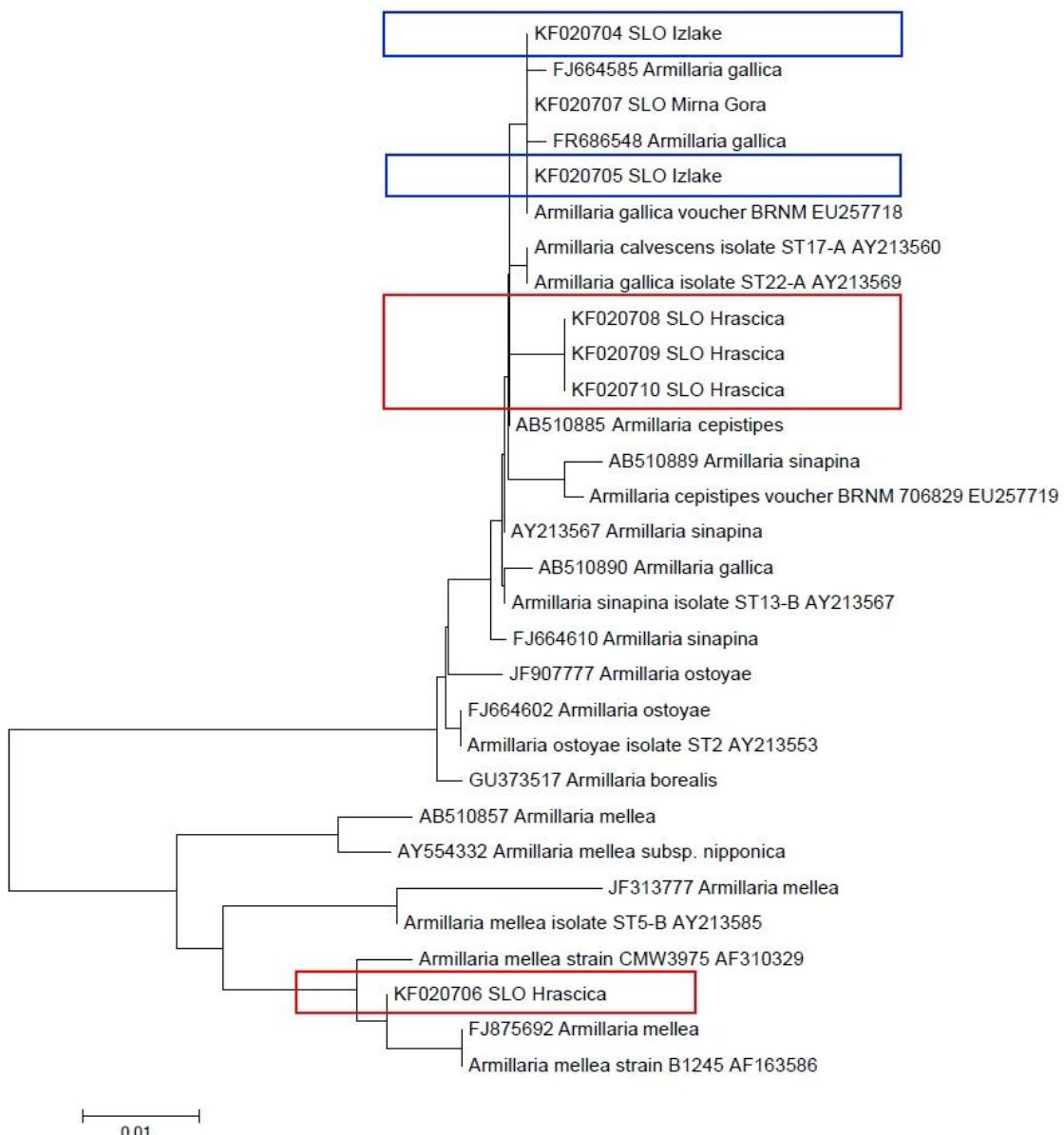


Slika 44: Korelacija med povprečnim deležem poškodovane krošnje in deležem okuženih koreničnikov treh izbranih klonov vrste *F. angustifolia*

Figure 44: Correlation between mean crown damage share and share of infected root collars of three selected *F. angustifolia* clones

Molekularna analiza oziroma natančnejša determinacija gliv iz rodu *Armillaria* spp. je bila uspešna le iz treh vzorcev. Iz filogenetskega drevesa lahko razberemo (slika 45), da sta bili

na podlagi sekvenc mraznici iz prvih dveh vzorcev (sekvenci KF020709 in KF020710 pripadata istemu vzorcu) določeni v skupino *A. cepistipes/A. sinapina*. Ker je slednja severnoameriška vrsta in v Evropi po dosedanjih podatkih ni prisotna, gre torej najverjetnejše za vrsto *A. cepistipes*. Mraznica iz tretjega vzorca je bila determinirana kot *A. mellea*.



Slika 45: Filogenetsko drevo izbranih vrst gliv iz rodu *Armillaria*, narejeno po analizi nukleotidnih zaporedij ITS rDNA z distančno metodo združevanja najbližjega soseda s programskim paketom MEGA5. Merilo predstavlja število nukleotidnih zamenjav. Z rdečo so označeni vzorci iz Hraščice, z modro pa vzorci iz jesenovega semenskega objekta Kropivnica pri Izlakah

*Figure 45: Phylogenetic tree of selected species from *Armillaria* genus based on the ITS-rDNA data set conducted in MEGA5. The tree was constructed using the neighbour-joining analysis. Scale bar indicates nucleotide substitutions per site. Samples from Hraščica are marked in red and samples from Koprivnica ash seed collecting stand near Izlake are marked in blue*

4.5 POŠKODOVANOST JESENOV V JESENOVIH SEMENSKIХ OBJEKTIH

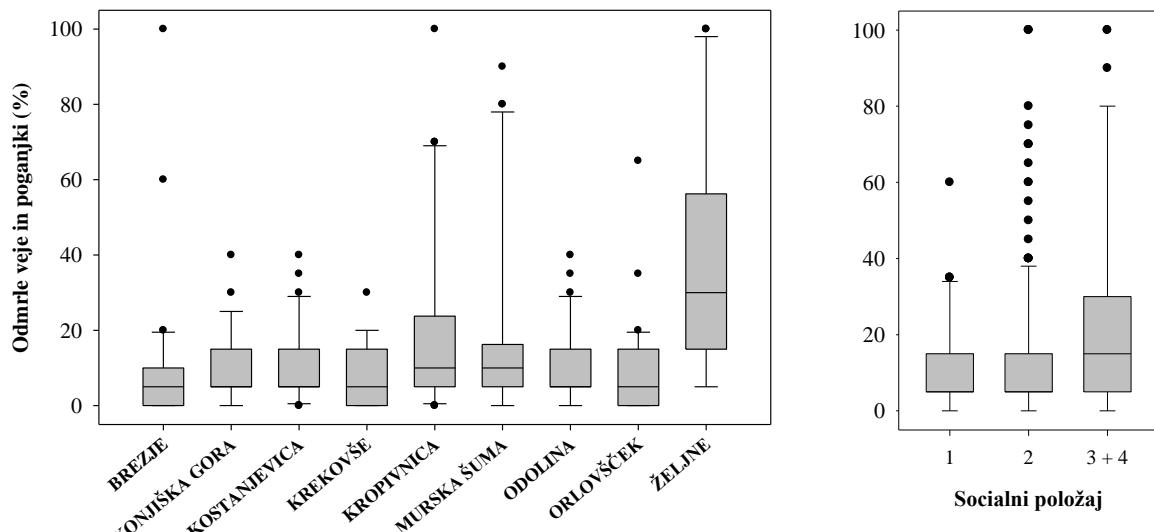
Poškodbe jesenov oziroma simptomi jesenovega ožiga so bili prisotni v vseh devetih izbranih jesenovih semenskih objektih (preglednica 12). Razlike v poškodovanosti jesenov med lokacijami so bile statistično značilne ($p < 0,001$). Izstopala je lokacija Željne (preglednica 12, slika 46), na kateri je bil delež odmrle krošnje statistično značilno večji od deleža odmrle krošnje na drugih lokacijah ($p < 0,05$), ne pa od deleža odmrle krošnje na lokaciji Kropivnica ($p = 0,06$). Razlike med ostalimi lokacijami niso bile statistično značilne. Povprečni delež odmrle krošnje je bil na osmih lokacijah med 7,2 in 19,3 % le na lokaciji Željne je bil ocenjen na 38,7 %. Na lokacijah Brezje, Kropivnica in Željne smo med 30 izbranimi drevesi odkrili vsaj eno odmrlo drevo. Na vseh izbranih lokacijah razen na lokaciji Željne smo odkrili jesene brez simptomov jesenovega ožiga. Upoštevajoč vsa drevesa iz vseh devetih lokacij, je bil delež odmrle krošnje sovladajočih in obvladanih dreves (3. in 4. socialni položaj) statistično značilno ($p = 0,02$) večji kot delež odmrlih krošenj vladajočih dreves (2. socialni položaj) ter tudi večji, vendar ne značilno ($p = 0,32$), od deleža odmrle krošnje dreves 1. socialnega položaja (slika 46).

Preglednica 12: Delež znamenj poškodovanosti, mraznice in odmrlih dreves na poskusnih ploskvah

Table 12: Share on symptoms, honey fungus and dead trees on research plots

Lokacija/ <i>Location</i>	Delež odmrle krošnje (%)*/ <i>Dead crown share</i> (%)*	Delež prezgodaj odpadlega listja (%)* <i>/Share of prematurely</i> <i>fallen leaves (%)</i> *	Delež okužb z mraznico (%)/ <i>Share of</i> <i>Armillaria infected</i> <i>trees (%)</i>	Delež odmrlih dreves (%)/ <i>Share</i> <i>of dead trees (%)</i>
Brezje	$7,7 \pm 2,7$	$9,3 \pm 3,2$	16,7	3,3
Konjiška gora	$10,3 \pm 1,8$	$1,8 \pm 1,1$	3,3	0
Kostanjevica	$10,8 \pm 1,8$	$0,2 \pm 0,2$	0	0
Krekovše	$7,2 \pm 1,5$	$7,8 \pm 1,4$	0	0
Kropivnica	$19,3 \pm 4,6$	$1,7 \pm 0,8$	3,3	3,3
Murska šuma	$17,7 \pm 4,6$	$0,5 \pm 0,4$	20,0	0
Odolina	$10,0 \pm 1,9$	$1,7 \pm 0,7$	0	0
Orlovšček	$9,5 \pm 2,4$	$1,0 \pm 0,4$	6,7	0
Željne	$38,7 \pm 5,4$	$0,5 \pm 0,4$	26,7	10,0
Skupaj/All	$14,6 \pm 1,2$	$2,7 \pm 0,5$	8,5	1,9

* Prikazana so povprečja in standardne napake/Means and standard errors are shown

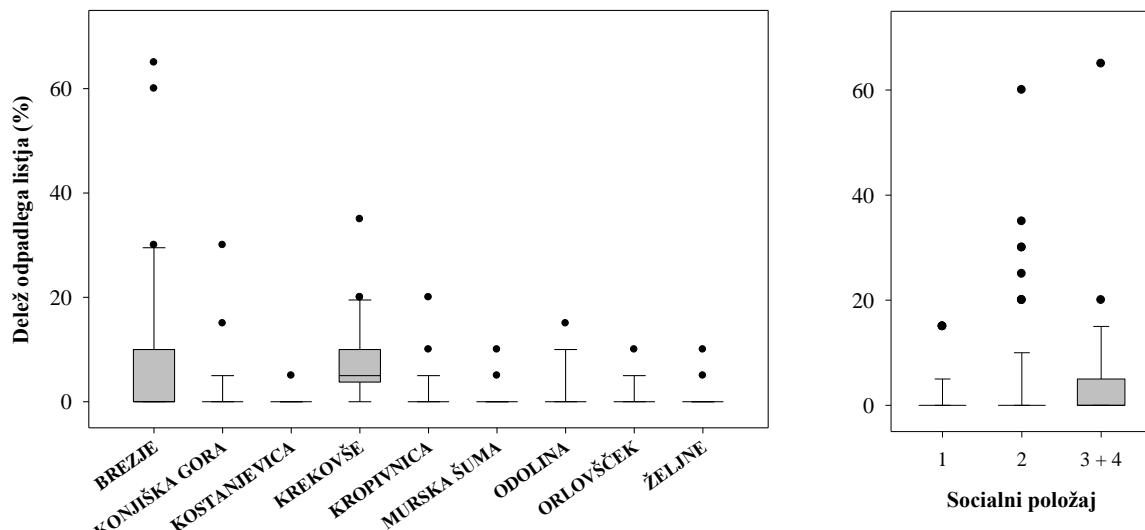


Slika 46: Delež odmrle krošnje jesenovih dreves na devetih različnih lokacijah v Sloveniji (levo); delež odmrle krošnje jesenovih dreves različnih socialnih položajev, upoštevajoč vse lokacije (desno)

Figure 46: Dead crown share of ash trees at nine different locations in Slovenia (left); dead crown share of ash trees of different social class (right)

Zgodnje odpadanje listja zaradi okužbe z glivo *C. fraxinea* smo opazili na vseh lokacijah (preglednica 12, slika 47). Iz popisanih dreves na sedmih lokacijah (Konjiška gora, Kostanjevica, Kropivnica, Murska šuma, Odolina, Orlovšček in Željne) je do naših popisov odpadlo povprečno manj kot 2 % listja. Ta delež je bil nekoliko večji na lokacijah Brezje in Krekovše, kjer je znašal 9,3 oziroma 7,8 %, vendar se je od preostalih sedmih lokacij statistično razlikovala le lokacija Krekovše ($p < 0,05$). Gledano vse raziskovalne ploskve skupaj, je bilo zgodnje odpadanje listja na drevju 3. in 4. socialnega položaja bolj izraženo kot na drevju 1. in 2. socialnega položaja (slika 47), vendar statistično značilnih razlik med socialnimi položaji nismo ugotovili ($p = 0,11$).

Na šestih lokacijah smo poleg simptomov jesenovega ožiga na jesenih oziroma na njihovih korenčnikih odkrili tudi okužbe z glivami iz rodu *Armillaria*. Največji delež dreves, okuženih z mraznico, je bil na lokaciji Željne (26,7 %), sledili sta lokaciji Murska šuma (20,0 %) in Brezje (16,7 %), na lokacijah Orlovšček (6,7 %), Konjiška gora (3,3 %) in Kropivnica (3,3 %) pa je bil ta delež manjši (preglednica 12). Vzorcev za determinacijo gliv *Armillaria* spp. v sklopu teh raziskav nismo jemali, smo pa ob drugi priložnosti odvzeli vzorec iz semenskega objekta v Kropivnici. Iz filogenetskega drevesa (slika 45) lahko vidimo, da je bil ta vzorec določen za vrsto *Armillaria gallica* Marxm. & Romagn (sekvence z oznako Izlake – objekt se nahaja v bližini Izlak).



Slika 47: Delež prezgodaj odpadlega listja iz jesenovih dreves na devetih različnih lokacijah v Sloveniji (levo); delež prezgodaj odpadlega listja z jesenovih dreves različnih socialnih položajev, upoštevajoč vse lokacije (desno)

Figure 47: Share of prematurely fallen ash leaves at nine different locations in Slovenia (left); share of prematurely fallen ash leaves of trees of different social class (right)

Drugih škodljivih organizmov, ki bi sodelovali v propadanju jesena, ni bilo veliko. V sestoju Krekovše smo na odpadlem listju v sledovih ugotovili jesenovo pepelovko (*Phyllactinia fraxini* (DC.) Fuss), predvsem na lokacijah Odolina in Kostanjevica pa je bilo na jesenovem listju pogosto mogoče opaziti izjede. Povzročitelja teh sicer nismo odkrili, vendar lahko na podlagi simptomov sklepamo, da gre najverjetneje za jesenovega rilčkarja (*Stereonychus fraxini* De Geer).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Vpliv temperature na glivo *Chalara fraxinea*

Rezultati naših raziskav kažejo na občutljivost glive *Chalara fraxinea* na temperature nad 30 °C. Na to kažejo tudi rezultati raziskave na Poljskem, v kateri so rast podgobja pri 30 °C opazili le pri treh od 30 testiranih izolatov glive (Kowalski in Bartnik, 2010). V isti raziskavi kot optimalno temperaturo za rast glive *C. fraxinea* navajajo 20 °C, čeprav je nekaj izolatov raslo hitreje pri temperaturi 15 °C oziroma 25 °C. V skladu s poljskimi ugotovitvami so tudi naši rezultati, ki kažejo, da so optimalne temperature za rast glive v čisti kulturi nekje med 20 in 22 °C (preglednica 5, slika 12). Gliva torej najbolje uspeva pri zmernih temperaturah, zato jo lahko uvrstimo med mezofilne organizme (Kowalski in Bartnik, 2010), ker pa raste tudi pri nizkih temperaturah (5 °C), jo lahko označimo kot psihrotolerantno vrsto (Deacon, 2006).

Ugotovili smo značilne razlike v hitrosti rasti med različnimi izolati glive *C. fraxinea* pri različnih temperaturah (preglednica 5). Izolati so se razlikovali tudi v kultivabilnosti po določenih obdelavah v poskušu segrevanja kultur glive. Ti rezultati znova kažejo na variabilnost izolatov, ki je bila ugotovljena že ob preučevanju morfoloških značilnosti kultur glive (Kowalski in Bartnik, 2010), patogenosti (Bakys in sod., 2009b; Ogris, 2009) in nekaterih genetskih markerjev (Bengtsson in sod., 2012; Kraj in sod., 2011; Rytkonen in sod., 2011).

Če primerjamo našo raziskavo z raziskavo na Poljskem (Kowalski in Bartnik, 2010), ugotovimo, da je variabilnost glede optimalnih temperatur med izolati v naši raziskavi precej manjša. Glavni razlog za to je majhno število izbranih izolatov. Glede na to, da je nekaj poljskih izolatov raslo pri 30 °C, naši izolati pa rasti niso kazali niti pri 28 °C, lahko sklepamo, da med izolate, ki smo jih uporabljali v naših raziskavah, najverjetneje nismo vključili osebkov glive, ki so bolj odporni na višje temperature. Prav zaradi tega je treba poudariti, da bi bila kultivabilnost (slika 13) po segrevanju kultur glive pri nekaterih temperaturah ob širšem izboru izolatov lahko nekoliko večja.

Predvidevamo, da je neuspešno precepljanje oziroma neuspešna kultivabilnost po topotnih obdelavah kultur glive *C. fraxinea* pomenila, da gliva obdelave ni preživila. V tem primeru lahko grafikon kultivabilnosti glive *C. fraxinea* po topotnih obdelavah kultur (slika 13) služi kot model preživetja glive v odvisnosti od časa izpostavljenosti različnim temperaturam. Na podlagi tega modela smo pričakovali, da bi gliva v lesnem tkivu morala preživeti segrevanja pri 36 °C, pet- oziroma deseturna segrevanja pri 44 °C pa ne. Poleg tega smo predvidevali, da se bomo z obdelavami pri 40 °C (predvsem z 10-urnim segrevanjem) precej približali

meji preživetja glive. Na naše presenečenje pa nam glive *C. fraxinea* v prvih dveh eksperimentih toplotne obdelave jesenovih tkiv (april 2010 in november 2010) ni uspelo izolirati iz nobene segrevane sadike oziroma poganjka. Uspešnost izolacije je bila nekoliko večja po tretjem poskusu toplotne obdelave (marec 2011), ko smo glivo *C. fraxinea* izolirali iz šestih poganjkov (30 %), ki smo jih pet ur segrevali pri 36 °C, in iz enega poganjka (5 %), ki smo ga pet ur segrevali pri 40 °C. Kljub temu pa je bila uspešnost izolacije omenjene glive še vedno opazno manjša od predvidene stopnje preživelosti (slika 13). Znano je, da se glive, ki rastejo na umetnih gojiščih, fiziološko nekoliko razlikujejo od gliv istih vrst, ki se razraščajo v tkivih gostiteljev (Blenis in sod., 1984). To potrjujejo tudi naši rezultati, saj je gliva *C. fraxinea*, kot kaže, v tkivih gostitelja veliko bolj občutljiva na toploto kot v čisti kulti. Seveda pa je treba dodati, da v tkivih gostitelja na glivo učinkujejo tudi drugi organizmi, ki naseljujejo okužena tkiva, tako da bi tudi to lahko vplivalo na izsledke naših raziskav.

Nekateri raziskovalci navajajo, da so glive po toplotni obdelavi v šoku, in da zaradi tega izolacija teh gliv takoj po segrevanju ni mogoča (Rooney in Gubler, 2001). V naših poskusih smo izolacije gliv iz segrevanih jesenovih tkiv naredili 24 ur po obdelavi, rast izoliranih gliv pa nato spremljali nadaljnjih 5 tednov in prepričani smo, da bi morebitni šok, ki bi ga glive doživele pri obdelavi, v tem času že minil. Poleg tega pa je treba omeniti, da začetek rasti kultur glive *C. fraxinea*, ki nam jih je uspelo izolirati iz obdelanih jesenovih poganjkov, ni prav nič zaostajal za začetkom rasti kultur iste glive, ki smo jih izolirali iz neobdelanih jesenovih tkiv.

Rastlinski patogeni so na nova območja zelo pogosto vneseni z mednarodnim trgovanjem živih rastlin (Santini in sod., 2013). Domnevajo, da je bila tudi gliva *C. fraxinea* pred kratkim v Veliko Britanijo vnesena z okuženimi sadikami velikega jesena (First report..., 2012). Uporaba učinkovite metode toplotne obdelave pred transportom sadik z okuženih območij na območja, kjer bolezen še ni prisotna, bi lahko občutno zmanjšala vnos in širjenje patogena na nova območja. Kljub temu gre pričakovati, da se bo gliva zaradi sposobnosti učinkovitega širjenja z askosporami na nekatera nova območja vseeno širila. Obdelava jesenovih sadik pred saditvijo na okuženih območjih bi imela nekoliko manjši pomen, saj bi se sadike po saditvi najverjetneje ponovno okužile, bi pa s tem preprečili prenos različnih genotipov glive med območji.

Pri toplotnih obdelavah z vodo je pomembno, da je temperatura vode dovolj visoka, da ubije patogena in obenem dovolj nizka, da ne poškoduje rastlinskih tkiv. Pri tem pomembno vlogo igra tudi trajanje obdelave (Agrios, 1997; Eguchi in sod., 2008). Eksperimenti toplotne obdelave jesenovih tkiv so pokazali, da je pet- oziroma 10-urno segrevanje pri 44 °C očitno uničujoče za jesenove sadike. Po drugi strani so segrevanja pri 36 °C pozitivno vplivala na obdelane sadike, saj so te sadike v primerjavi z neobdelanimi sadikami odgnale nekoliko prej in so bile v času opazovanj videti bolj vitalne. Delež preživetih sadik je bil zelo velik

tudi po topotnih obdelavah pri 40 °C. Izjema je bilo le peturno segrevanje v prvem poskusu (april 2010), vendar je treba poudariti, da smo takrat v poskusu uporabili precej močno okužene sadike, kar bi lahko bilo razlog za presenetljivo nizko stopnjo preživetja (60 %). Kot kaže, pa smo se s peturnim segrevanjem pri 40 °C zelo približali meji preživetja glive *C. fraxinea* v jesenovih tkivih. Rezultati kažejo, da 10-urna obdelava pri 40 °C najverjetneje zadošča za popolno eradikacijo patogena, vendar pa se s to obdelavo močno približamo točki, ko je ogroženo tudi preživetje obdelanih sadik. Ker pa je bila ničelna uspešnost izolacije dosežena tudi iz sadik oziroma poganjkov, ki smo jih 10 ur segrevali pri 36 °C, je najverjetnejše ključ do uspeha časovno daljša topotna obdelava pri nekoliko nižji temperaturi (npr. 36 – 38 °C). Kakor koli, večina znanih topotnih obdelav poteka krajsi čas pri nekoliko višjih temperaturah (Agrios, 1997), zato bi bilo mogoče smiselno preizkusiti eno- do dvourna segrevanja nad 40 °C oziroma 44 °C.

Rezultati naših raziskav kažejo, da obstajajo možnosti za razvoj učinkovite eradikacijske metode glive *C. fraxinea*, vendar so za to potrebne nadaljnje raziskave. Metoda, ki smo jo uporabili v naših raziskavah, je dokazano uporabna za topotno obdelavo jesenovih sadik. Ker pa gliva *C. fraxinea* okužuje tudi jesenovo seme (Cleary in sod., 2013a), predvidevamo, da bi se lahko podobna metoda uporabljala tudi za zatiranje glive v okuženih semenih.

Uspešnost izolacije glive *C. fraxinea* iz dreves, ki kažejo znake starih okužb s to glivo, je zelo majhna, saj glivo v okuženih tkivih domnevno sčasoma nadomestijo hitrejerastoče endofitne in saprofitske glive (Kowalski in Holdenrieder, 2008). Prav nasprotno pa je gliva *C. fraxinea* najpogostejša in velikokrat edina uspešno izolirana gliva iz jesenovih tkiv, ki kažejo zgodnje simptome okužbe (Kirisits in sod., 2009; Kirisits in sod., 2008). Majhna uspešnost izolacije glive *C. fraxinea* in veliko število drugih izoliranih gliv v prvem poskusu topotne obdelave aprila 2010 (slika 14) ter velika uspešnost izolacije glive *C. fraxinea* iz kontrolnih poganjkov s svežimi nekrozami novembra 2010 in marca 2011 (slike 14 in 15) potrjujejo zgornje ugotovitve.

Stopnja preživetja glive *C. fraxinea* v okuženih jesenovih tkivih se je s peturnim segrevanjem pri 36 °C močno zmanjšala (slike 13, 14 in 15). Meritve temperatur v jesenovih sadikah, ki so rasle na vrtu GIS, so pokazale, da se lahko v določenih primerih podobne razmere pojavijo tudi v lesu znotraj sadik. Temperature v lesu sadik, ki so bile izpostavljene soncu, so v najtoplejših poletnih dneh za približno pet ur presegle 36 °C, pri čemer so za krajše obdobje presegle celo 40 °C (slika 17). Na podlagi teh meritev lahko sklepamo, da vroče poletne razmere lahko značilno vplivajo na preživetje glive *C. fraxinea* v okuženih jesenovih tkivih. Pri tem ni nujno, da toplota glivo ubije, lahko jo samo oslabi do te mere, da jo lažje nadomestijo nekatere druge glive, ki so na take temperaturne razmere bolj prilagojene. Da so nekatere glive, ki naseljujejo jesenova tkiva, resnično bolj odporne na toploto kot gliva *C. fraxinea*, kažejo tudi uspešne izolacije nekaterih gliv iz okuženih sadik, ki smo jih 10 ur segrevali pri 40 °C oziroma pet ur pri 44 °C (preglednica 6).

V naši raziskavi so sadike, na katerih smo merili temperaturo, rasle bolj ali manj na prostem. Izpostavljenost soncu je bila tako daljša in ekstremnejša, kot bi bila, če bi te sadike uspevale v gozdu pod krošnjami drugih dreves. Razvoj dovolj ekstremnih temperturnih razmer, ki bi ogrozile preživetje glive *C. fraxinea* v okuženih jesenovih tkivih, na zasenčenih mestih po vsej verjetnosti ni mogoč.

Konidiji glive *C. fraxinea* niso kaljivi in tako niso zmožni povzročiti okužbe (Kirisits in sod., 2009), najverjetneje pa kot spermaciji igrajo pomembno vlogo v procesu oblikovanja apotecijev (Gross in sod., 2012b). Okužbe jesenov torej povzročajo askospore. O tem, kako temperature in drugi dejavniki vplivajo na razvoj glive in bolezenskega cikla, ni veliko znanega. Kakor koli, askospore so občutljive na sušo (Gross in sod., 2014), nasprotno pa večje količine padavin in večja zračna vlaga pozitivno vplivajo na sproščanje askospor in na potek okužbe (Kirisits in sod., 2009). Apotecije glive *H. pseudoalbidus* lahko v Sloveniji odkrijemo od sredine maja (Ogris, 2009) pa do sredine oktobra (osebna opazovanja). Okužbe in začetna kolonizacija jesenovih tkiv poteka torej v toplejši polovici leta. Naši rezultati kažejo na to, da bi lahko bil ta proces v naših klimatskih razmerah zaradi vse pogostejših ekstremno vročih poletnih obdobij pogosto oviran. Še nekoliko bolj neustrezna za razvoj jesenovega ožiga pa bi lahko bila sušna obdobja, ki pa pravzaprav z obdobji vročega vremena pogosto sovpadajo. Nekoliko toplejša klima v južnem delu Evrope torej glivi *C. fraxinea*, kot kaže, ne ustreza tako zelo kot hladnejša klima severnega dela kontinenta. Prav zaradi tega predvidevamo, da jesenov ožig pri nas ne bo povzročil tako velike škode, kot jo je povzročal in jo še v nekaterih državah severnega dela Evrope.

5.1.2 Vpliv izbranih fungicidov in uree na glivo *Chalara fraxinea*

Izmed osmih testiranih fungicidov je rast glive *C. fraxinea*, pa tudi formiranje apotecijev teleomorfa glive najbolje zatiralo sredstvo Bavistin oziroma aktivna snov karbendazim. To sredstvo je edino popolnoma preprečilo rast glive *C. fraxinea* na vseh treh testiranih koncentracijah (preglednica 7, slika 19), prav tako pa je edino od testiranih sredstev vsaj pri največji koncentraciji popolnoma preprečilo oblikovanje apotecijev (preglednica 9, sliki 22 in 23). Karbendazim uvrščamo v skupino benzimidazolov, ki veljajo za mitotični strup. Aktivne snovi iz te skupine se namreč pretvorijo v metil benzimidazol-2-il-karbamat (MBK), ki se veže na vretena mikrotubulov in ovira delitev jedra. Vplivajo pa tudi na rast hif, saj se MBK veže tudi na citoplazemske mikrotubule (Deacon, 2006).

Drugo najučinkovitejše sredstvo je bilo Octave. Aktivno snov prokloraz uvrščamo v skupino imidazolov, ki inhibirajo sintezo ergosterola. V celične membrane gliv se zato vključujejo drugi steroli, zaradi česar začnejo puščati membrane, čemur sledi smrti celic (Deacon, 2006).

Obe zgoraj omenjeni aktivni snovi imata torej precej specifičen način delovanja, ki je značilen za sistemične fungicide. Problem pri tem je, da glive proti takim snovem precej lahko razvijejo odpornost, običajno zadošča že mutacija enega gena. Temu se lahko izognemo s pravilno strategijo uporabe fitofarmacevtskih sredstev. To pomeni, da uporabljamo sredstva z različnimi načini delovanja, ali pa sistemične fungicide kombiniramo s kontaktnimi protektivnimi fungicidi. Ti vplivajo na osnovne metabolične procese in imajo širši spekter delovanja (Deacon, 2006). Med kontaktne protektivne fungicide uvrščamo prav vse preostale aktivne snovi, ki smo jih uporabili v naši raziskavi. Med njimi sta se za najučinkovitejša izkazala klorotalonil in tiram. Kot smo omenili v uvodu, je prav klorotalonil v kombinaciji s karbendazimom (sredstvo Daconil Plus) učinkovito zatiral glivo *Gremmeniella abietina* (Santamaría in sod., 2007) in morda je prav to kombinacija, ki bi jo bilo tudi v primeru jesenovega ožiga dobro testirati v praksi.

Pirimetanil, fenheksamid in iprodion se v preliminarnem testu niso izkazali za učinkovite in v glavni del eksperimentov sploh niso bili vključeni. Kljub temu je potrebno poudariti, da bi ta sredstva lahko pokazala boljše rezultate, če bi bili poskusi zasnovani nekoliko drugače. Pirimetanil predvsem onemogoča okužbo rastlin, saj preprečuje izločanje glivnih encimov, ki so potrebni za izvršitev infekcije (Tomlin, 2003). Iprodion in fenheksamod delujeta na začetne faze razvoja gliv, saj onemogočata oblikovanje kličnega mešička oziroma preprečujeta kalitev spor (Tomlin, 2003). Prav zaradi tega predvidevamo, da bi bili rezultati naših raziskav precej drugačni, če bi gojišča, ki so jim bili dodani fungicidi, inokulirali s suspenzijo trosov in ne s koščki gojišča, ki jih je preraščal micelij patogena.

Uporaba fungicidov v slovenskih gozdovih ni dovoljena. Ker je bolezen razširjena po vsej državi in je infekcijski potencial patogena najverjetneje povsod precej velik, je upravičena uporaba fitofarmacevtskih sredstev tudi druge vprašljiva. Npr. kemična obdelava sadik v drevesnicah bi bila smiselna (podobno kot v primeru topotne obdelave) samo, če bi sadike nato posadili na območja, kjer bolezen še ni prisotna. Uporaba fungicidov pri nas bi bila tako smiselna le v primeru zaščite zavarovanih dreves oziroma jesenov posebnih vrednosti. Cook in sod. (2013), ki so podobno kot mi naredili pregled možnih načinov kemičnega zatiranja glive *C. fraxinea*, predvidevajo, da bi bila najverjetneje smiselne le zaščitne obdelave, ki bi preprečile oziroma zmanjšale število okužb, ne pa obdelave za eradicacijo glive v okuženih drevesih. Ker se gliva hitro razširi v vsa gostiteljeva tkiva, bi namreč težko dosegli, da bi bile koncentracije aktivnih snovi povsod dovolj velike, da bi glivo uničili.

Cook in sod. (2013) so izpostavili, da so posebej pomembne obdelave odpadlega okuženega listja oziroma ukrepi za zmanjšanje inokulum glive *C. fraxinea*. Zanimivo je, da pri tem omenjajo, da bi bil lahko učinkovit prav karbendazim oziroma druge snovi iz skupine benzimidazolov, saj so precej obstojni in zavirajo sporulacijo gliv. Pri tem pa opozarjajo, da fungicidi morda niso zmožni prodreti v pseudosklerocijske strukture, ki se oblikujejo na odpadlih pecljih, in ubiti glive. Pseudosklerocijske plošče glivi *C. fraxinea* namreč služijo

za prezimovaje oziroma za preživetje določenih neugodnih razmer. Tako npr. gliva lahko sušno leto preživi v peclju, apotecije pa razvije šele v naslednjem letu, ko so vremenske razmere za to ustreznajše (Gross in Holdenrieder, 2013). Podobno bi lahko tudi v primeru obdelave pecljev s fungicidi (še posebej v primeru fungistatičnega delovanja) gliva v sklerocijski plošči čakala, da bi se aktivna snov razgradila oziroma sprala, nato pa normalno nadaljevala razvoj in oblikovanje trosišč. V naši raziskavi je karbendazim pri koncentraciji (10 mg/l) preprečil razvoj apotecijev (preglednica 9, slika 23), ne vemo pa, ali je gliva v pecljih preživelna. To bi lahko ugotovili z nadaljnjam gojenjem pecljev, ki bi jih prej še sprali z vodo oziroma z izolacijami v čiste kulture.

Če fungicidi niso sposobni ubiti glive na odpadlih listnih pecljih, preprečijo pa razvoj apotecijev, bi jih bilo najbrž treba večkrat nanašati. Zaradi velikega negativnega vpliva na okolje je to najverjetneje nesprejemljivo. Prav zaradi tega bi bila primernejša obdelava z ureo. Ta snov ovira rast glive *C. fraxinea* in preprečuje razvoj apotecijev patogena, poleg tega pa pospeši tudi razgradnjo pecljev.

Verjetnih razlogov za oviran razvoj patogena je več oziroma gre najverjetneje za kombinacijo delovanja treh različnih dejavnikov. Prvi možni dejavnik je toksičnost amonijaka, ki se sprošča ob razgradnji uree. Nekatere raziskave kažejo, da toksično na glive deluje tudi urea sama (Veverka in sod., 2007). Drugi možni dejavnik je povišan pH. Prav povišane pH-vednosti po nanosih uree na panje naj bi bile razlog za oviran razvoj borovega trohnobneža, glive *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref., ki velja za enega najnevarnejših patogenov iglavcev (Johansson in sod., 2002). Zadnji možni razlog, ki bi lahko onemogočal normalen razvoj patogena, je antagonizem oziroma kompeticija z drugimi mikroorganizmi, ki jim razmere, nastale po obdelavi z ureo, bolj ustrezano.

Da urea zavira rast glive *C. fraxinea*, smo dokazali z gojenjem glive na gojiščih, ki jim je bila dodana različna koncentracija uree (preglednica 8, sliki 19 in 20). Ali rast glive ovira urea sama ali amonijak, ki bi se sproščal ob razgradnji uree, nismo preverjali. Na gojiščih z večjo koncentracijo uree smo po koncu testov namerili višje pH-vrednosti (rezultati niso prikazani) kot na kontrolnih gojiščih oziroma na gojiščih z manjšimi koncentracijami uree, tako da obstaja možnost, da tudi v primeru jesenovega ožiga pomembno vlogo igra pH-vrednost substrata, v katerem se gliva razvija. Kljub vsemu bi morali za kakršne koli sklepe narediti nadaljnje raziskave.

Vsekakor pa smo z našimi testi dokazali, da obdelava z ureo vpliva na kompeticijo med *C. fraxinea* in drugimi glivami. Obdelave (predvsem z večjimi koncentracijami uree) so namreč preprečile razvoj apotecijev glive *H. pseudoalbidus*, pospešile pa razvoj drugih gliv. Kot smo omenili, smo z izolacijami v čiste kulture ugotovili, da je šlo največkrat za glive iz rodu *Fusarium*, na obdelanih pecljih pa smo pogosto odkrili tudi glive iz skupine koprinoidnih gliv. Nekatere glive iz te skupine uvrščamo med amonijske glive, za katere je značilno, da

oblikujejo trosišča prav na substratu z veliko vsebnostjo amonijaka oziroma druge z dušikom bogate snovi. Obdelava z ureo pa ne vpliva samo na gline, ampak na splošno povečuje mikrobiološko delovanje. Za hitrejšo razgradnjo substrata so npr. izredno pomembne tudi bakterije (Green in sod., 2006).

Učinkovitost fungicidov oziroma uree je vsekakor treba testirati tudi v praksi. Naši rezultati kažejo, da bomo morali biti pozorni na uporabo zadostnih koncentracij. Predvsem manjše koncentracije uree so na oblikovanje apotecijev in rast gline v čisti kulti v delovalne pozitivno. Tako se je npr. na pecljih, ki smo jih obdelali s koncentracijo 0,5 g/l v povprečju razvilo 5,28 apotecija, na kontrolnih pecljih pa le 2,86 (slika 26). Manjše koncentracije nekaterih fungicidov sicer niso povečale števila razvitih apotecijev, so pa pozitivno vplivale na velikosti trogovnic. V nekaterih primerih je bila tako povprečna površina apotecijev, izražena na centimeter peclja, na s fungicidi obdelanih pecljih večja kot na pecljih, ki smo jih obdelali le z vodo (slike 21, 22 in 23). V praksi se za zatiranje jablanovega škrlupa (*V. inaequalis*) in češnjeve listne pegavosti (*B. jaapii*) uporablajo 2,5% oziroma 5% raztopine uree. Nekatere raziskave pravzaprav kažejo, da so bolj primerne obdelave z 2,5% koncentracijo, saj večje koncentracije uree lahko v določenih primerih škodujejo gostitelju oziroma negativno vplivajo na mikroorganizme, ki sodelujejo v razgradnji obdelanega listja (Bengtsson in sod., 2006; Green in sod., 2006; Pedersen in Hansen, 1997). Podobno so se tudi v našem testu druge gline na pecljih, ki smo jih namakali v raztopini z vsebnostjo uree 5 g/l, pojavile prej in rasle intenzivneje kot na pecljih, ki so bili potopljeni v raztopini z večjo koncentracijo uree (10 g/l).

Potek poskusa obdelave jesenovih pecljev z ureo je bil nekoliko moten. Ker se apoteciji na pecljih niso normalno razvijali (tudi na kontrolnih pecljih ne), smo petrijevke s obdelanimi peclji prenesli v prostor, kjer je bila temperatura nižja (21 °C) kot v prostoru, kjer so bile petrijevke sprva shranjene (23–25 °C). Trosišča so se pri nižji temperaturi potem normalno razvila. To ponovno kaže na to, da je gliva *C. fraxinea* občutljiva na nekoliko višje temperature, kar smo dokazali tudi v drugih poskusih naših raziskav. Višje temperature domnevno vplivajo tudi na kompeticijo med glivo *C. fraxinea* in drugimi glivami, torej bi omenjene temperature (23–25 °C) lahko pomembno vplivale tudi na rezultate konkretnega poskusa. Ali bi urea pri koncentraciji 2,5 g/l tudi pri nižjih temperaturah popolnoma preprečila razvoj apotecijev, ne vemo, na podlagi preliminarnih testov (rezultati niso prikazani) pa predvidevamo, da bi za to zadoščala koncentracija 5 g/l. V preliminarnem testu smo namreč peclje obdelali s koncentracijami 5, 10 in 20 g/l, nato pa smo jih hranili pri temperaturah med 17 in 23 °C. Apoteciji so se na kontrolnih pecljih normalno razvili, vse tri koncentracije uree pa so popolnoma preprečile razvoj apotecijev.

Kako bi na učinkovanje uree vplivale še nižje temperature, ne vemo, vsekakor pa bi bilo pri nizkih temperaturah upočasnjeno mikrobiološko delovanje in s tem razgradnja listja. To vsekakor vpliva na čas obdelave. Raziskave v primeru jablanovega škrlupa (*V. inaequalis*)

so pokazale, da spomladansko sporulacijo patogena v največji meri zatre jesenska obdelava pred odpadanjem listja (Sutton in sod., 2000). Če to ne pride v poštev zaradi možnih poškodb gostitelja, je treba ureo nanesti na odpadlo listje. V tem primeru iste raziskave kažejo, da je spomladanska obdelava učinkovitejša od jesenske.

Pred kakršno koli uporabo kemičnih sredstev za zatiranje jesenovega ožiga je treba laboratorijske rezultate preveriti tudi na terenu oziroma v naravi. Če se bo kakšno sredstvo izkazalo za učinkovito, je potrebna registracija tega sredstva za uporabo na jesenih. V Sloveniji namreč skorajda nimamo registriranih fitofarmacevtskih sredstev za uporabo na drevesnih vrstah (izjema je npr. sredstvo za zatiranje hrastove pepelovke). Tudi če bo do registracije takega sredstva prišlo, pa bo še vedno treba dobro premisliti, kje in v katerih primerih je uporaba smiselna in upravičena.

Alternativa kemičnim sredstvom je vsekakor biološko zatiranje škodljivcev. V primeru jesenovega ožiga Cook in sod. (2013) predlagajo testiranje t. i. ECOspraya, katerega glavna učinkovina je ekstrakt česna. Mi smo morebitne naravne sovražnike glive *C. fraxinea* iskali med glivami, ki smo jih izolirali iz simptomatičnih jesenovih tkiv (o tem bomo razpravljali v naslednjem poglavju), smo pa enega naključno odkrili prav pri poskusu z ureo in jesenovimi peclji. V eni izmed petrijevk s peclji so se približno tri tedne po obdelavi pojavile ličinke, ki so požrle popolnoma vse glive, ki so uspevale na pecljih. Okoli pecljev so ostali le iztrebki teh ličink (slika 48 levo). V tej petrijevki sicer ni bilo apotecijev glive *H. pseudoalbidus*, vendar smo v drugih poskusih večkrat odkrili prisotnost ličink iste vrste in takrat smo se prepričali, da se te ličinke prehranjujejo tudi z apoteciji glive, ki povzroča jesenov ožig. Počakali smo, da so se razvili odrasli osebki (slika 48 zgoraj), in ugotovili, da gre za muhe iz družine Sciaridae. Te muhe, ki jih uvrščajo med t. i. »fungus gnats«, živijo v zemlji oziroma opadu in se prehranjujejo z glivami in živalskimi iztrebki. Ker so generalisti, ne gre pričakovati, da bi lahko služili za zatiranje jesenovega ožiga.



Slika 48: Muhe iz družine Sciaride (zgoraj) oziroma njihove ličinke so požrle vse glive, ki so uspevale na pecljih v eni izmed petrijevk. Okoli pecljev so vidni iztrebki ličink (levo)

Figure 48: Flies from Sciaridae family (up) in fact, their larvae ate all fungi that grew on leaf petioles in one of the petri dish. Larval faeces are visible around the leaf petioles (left)

5.1.3 Interakcije med glivo *C. fraxinea* in drugimi glivami, ki smo jih izolirali iz jesenovih tkiv

Kot smo že omenili v prejšnjih poglavjih, glivo *C. fraxinea* v okuženih jesenovih tkivih dokaj hitro nadomestijo drugi mikroorganizmi. Predvsem iz tistih jesenov, ki kažejo znake starih okužb z jesenovim ožigom, je zato pogosto mogoče izolirati tudi številne druge glive. Tako smo tudi mi v poskusu toplotne obdelave okuženih sadik velikega jesena glivo *C. fraxinea* izolirali le iz 20 % kontrolnih sadik (temperatura torej ni bila dejavnik, ki bi vplival na rezultat izolacij), smo pa iz istih sadik pridobili številne izolate drugih gliv (slika 14, preglednica 6). Da se v tkivih, ki jih je okužila gliva *C. fraxinea*, hitro pojavijo druge glive, kažejo tudi reisolacije gliv, ki smo jih izvedli dva meseca po inokulaciji glive *C. fraxinea* v vejice jesenovih klonov v Hraščici. Čeprav smo izolacije naredili iz roba nekroz (torej iz tkiv, ki so bila kolonizirana zadnja), smo tudi v tem primeru pridobili kar nekaj izolatov drugih gliv. Pri tem je treba poudariti, da je nekatere glive zaradi njihove hitre rasti lažje izolirati. Samo na podlagi izolacij gliv v čiste kulture torej ne moremo trditi, da so druge glive v simptomatičnih tkivih glivo *C. fraxinea* tudi dejansko nadomestile oziroma kako drugače onemogočile.

Kakor koli, naše raziskave interakcij med glivo *C. fraxinea* in drugimi glivami, ki smo jih izolirali iz jesenovih tkiv, kažejo, da je v dvojnih kulturah gliva *C. fraxinea* večinoma v podrejenem položaju. Kar 13 od 19 testiranih gliv je namreč po stiku s kolonijo glive *C. fraxinea* slednjo začelo preraščati oziroma se vraščati vanjo. Ko smo koščke gojišča iz mest

vraščanja oziroma preraščanja kolonij prenesli na nova gojišča, se iz njih nikoli ni razrasla gliva *C. fraxinea*, temveč vedno samo druga gliva. Počasnejša rast glive *C. fraxinea* v vseh primerih ne more biti razlog za to, saj npr. glivi *Hyalodendriella* sp. in *Coniochaeta* sp. rasteta še počasneje. To kaže, da nekatere glive resnično lahko onemogočijo rast glive *C. fraxinea*. Nadaljnje raziskave pa bodo potrebne, da bomo ugotovili, na kakšen način to storijo, katere vrste so pri tem najučinkovitejše in ali gliva *C. fraxinea* pri tem tudi odmre.

Najhitreje je kolonijo glive *C. fraxinea* prerasla gliva *Hypocrea* sp. (anamorf: *Trichoderma* sp.). Glive iz rodu *Trichoderma* so znane po svojih antagonističnih lastnostih do drugih gliv in jih pogosto uporabljajo za zatiranje različnih patogenov (Harman, 2006; Deacon, 2006). Te glive namreč proizvajajo različne antibiotične produkte, v bližini drugih gliv izločajo protiglivne encime, kot sta hitinaza in β -1,3-glukanaza, lahko pa tudi neposredno parazitirajo na miceliju drugih gliv. Poleg tega na patogene vplivajo posredno, saj lahko povečujejo odpornost gostitelja in pospešujejo njegovo rast (Harman, 2006; Regliński in sod., 2012).

Od drugih gliv v našem testu so glivo *C. fraxinea* v kulturi najbolj intenzivno preraščale glive iz rodu *Phomopsis* (anamorf) oziroma *Diaporthe* (teleomorf). Glive iz omejenih rodov so med najpogostejšimi glivami, ki so bile izolirane iz jesenovih tkiv, ki so kazali znake okužbe z jesenovim ožigom (Bakys in sod., 2009b; Kowalski in Holdenrieder, 2009a; Kowalski in Łukomska, 2005; Przybyl, 2002). Tudi v našem poskusu segrevanja sadik jesena so bile omenjene glive najpogosteje izolirane (preglednica 6). Iz tega lahko sklepamo, da glivo *C. fraxinea* tudi v naravi zatirajo. Kowalski in Holdenrieder (2009a) sicer omenjata, da te glive večinoma uvrščamo med endofite, vendar se je v raziskavi na Švedskem izkazalo, da je bila prav gliva iz rodu *Phomopsis* ena redkih gliv, ki je v testu patogenosti uspela povzročiti nekroze na inokuliranih sejankah velikega jesena (Bakys, 2009b). Zanimivo, da v istem testu gliva *D. viticola* ni povzročila nekroz na jesenovih sejakah. V pregledu literature nismo odkrili, da bi se vrste iz rodu *Phomopsis* uporabljalo za zatiranje drugih gliv, uporabljajo se pa za zatiranje plevelov (Udayanga in sod., 2011).

Še ena gliva, ki je bila v sklopu naših raziskav med najpogosteje izoliranimi glivami iz simptomatičnih jesenovih tkiv (preglednica 6) in je relativno dobro preraščala kulture glive *C. fraxinea*, je *Alternaria alternata*. Tudi v drugih raziskavah so ugotovili, da je zelo pogosto prisotna v tkivih, ki kažejo simptome jesenovega ožiga (Pukacki in Przybyl, 2005; Lygis in sod., 2005; Przybyl, 2002; Bakys in sod., 2009b; Kowalski in Holdenrieder, 2009a). Tudi *A. alternata* je v testih patogenosti uspela povzročiti nekroze na sejankah velikega jesena (Bakys, 2009b).

Kowalski in Bartrik (2010) omenjata, da so kolonije glive *C. fraxinea* včasih preraščale druge glive, ki so bile skupaj s povzročiteljico jesenovega ožiga izolirane iz nekrotičnih jesenovih tkiv. Pri tem je zanimivo to, da je bilo med omenjenimi glivami in glivo *C. fraxinea* pogosteje opaziti 3–12 mm široko inhibicijsko cono, ki naj bi preprečevala, da bi

glivo *C. fraxinea* prerasle hitro rastoče glive iz rodov *Alternaria*, *Epicoccum*, *Phomopsis* in *Diplodia*. Torej tudi glive iz rodu *Phomopsis* in *A. alternata*, ki so v našem poskusu preraščale glivo *C. fraxinea*, so v njihovi raziskavi v kulturah s povzročiteljico jesenovega ožiga oblikovale inhibicijsko cono. Pri tem je treba omeniti, da smo mi v našem testu uporabili samo en izolat glive *C. fraxinea*. Glede na velike razlike v določenih lastnostih med izolati glive *C. fraxinea* bi morda z uporabo katerega drugega izolata dobili nekoliko drugačne izolate. Po drugi strani se lahko tudi glive iz rodu *Phomopsis* oziroma osebki glive *A. alternata* razlikujejo v možnosti preraščanja glive *C. fraxinea*. Sicer pa smo tudi v naši raziskavi opazili inhibicijske cone med glivo *C. fraxinea* in glivo iz rodu *Epicoccum* (*E. nigrum*), poleg tega pa tudi med glivo *C. fraxinea* in *Fusarium* sp. Prav gliva *E. nigrum* se pogosto omenja kot učinkovito sredstvo za zatiranje nekaterih rastlinskih patogenov (Agrios, 1997, De Cal in sod., 2009; Falconi in Mendgen, 1994; Larena in sod., 2005; Witting in sod., 1997; Zhou in Reeleeder, 1990) in morda bi se jo dalo uporabiti tudi za zatiranje jesenovega ožiga. Njena pogosta prisotnost v okuženih jesenovih tkivih kaže na to, da opravlja vlogo naravnega sovražnika glive *C. fraxinea*. Še enkrat pa moramo omeniti, da je tudi ta gliva pokazala določeno stopnjo patogenosti za jesen (Bakys in sod., 2009b).

Kowalski in Bartnik (2010) sta v isti raziskavi opazila, da nekatere kulture glive *C. fraxinea* oblikujejo posebne bele kristalne skupke. Grad in sod. (2009) so ugotovili, da ti skupki vsebujejo viridin in viridiol. Prav mikotoksični viridin naj bi bil tudi odgovoren za oblikovanje inhibicijskih con v mešanih oziroma dvojnih kulturah. Zelo pogosto smo te kristalne skupke opazili tudi na kolonijah glive *C. fraxinea* v našem poskusu (slika 49), vendar, kot kažejo rezultati, ti večinoma niso bili dovolj, da bi se *C. fraxinea* obranila pred preraščanjem drugih gliv.



Slika 49: Kolonije glive *C. fraxinea* so v dvojnih kulturah pogosto oblikovale kristalne skupke, ki naj bi vsebovali viridin in viridiol

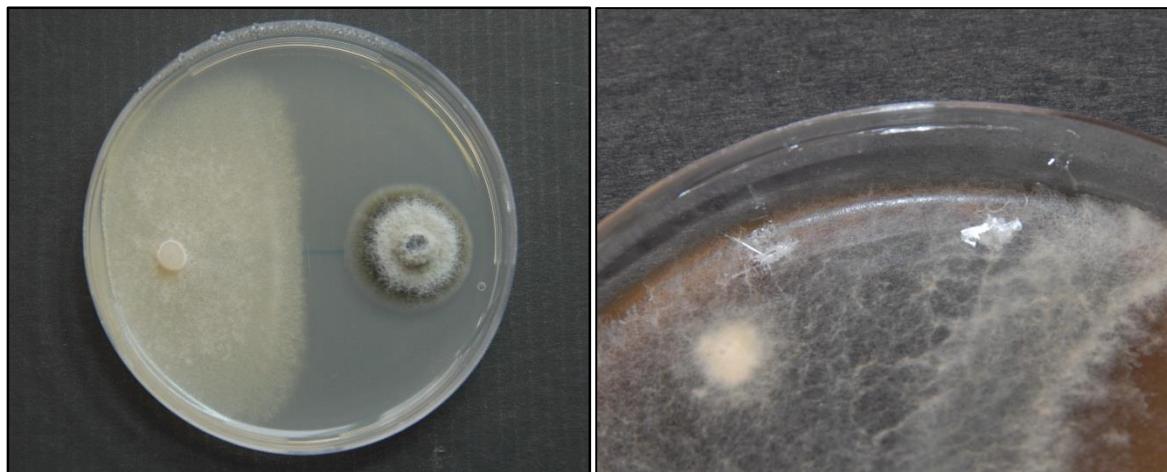
Figure 49: Colonies of *C. fraxinea* in dual cultures often formed crystalline structures, which supposed to contain viridin and viridiol

Ostale glive, ki so v dvojnih kulturah preraščale glivo *C. fraxinea*, so bile pri tem manj uspešne. Iz tega vidika so morda te glive tudi manj primerne za zatiranje jesenovega ožiga, vendar pa je treba poudariti, da bi raziskava interakcij med glivami v naravnem okolju (ne v

laboratoriju) lahko dala drugačne rezultate. Izmed gliv, ki so manj intenzivno preraščale kolonije glive *C. fraxinea*, bi bilo morda v nadaljnje raziskave dobro uvrstiti predvsem glivi *Hyalodendriella* sp. in *Hypoxyylon howeanum*.

V raziskavah na Kitajskem (Zhong in sod., 2011; Meng in sod., 2012) so odkrili, da izolat endofitne glive *Hyalodendriella* sp., ki so jo izolirali iz zdravih tkiv topolovega hibrida 'Neva' (*Populus deltoides* × *Populus nigra*), proizvaja različne protimikrobnne snovi, ki naj bi svojemu gostitelju pomagale pri zaščiti pred škodljivci. Ker se je rast glive *C. fraxinea* v dvojnih kulturah z glivo *Hyalodendriella* sp. že relativno kmalu končala (slika 50), predvidevamo, da tudi gliva *Hyalodendriella* sp., ki smo jo v testu uporabili mi, proizvajala določeno snov, ki zavira oziroma onemogoča rast glive *C. fraxinea*.

Med glivo *C. fraxinea* in *H. howeanum* na videz večjih interakcij ni bilo opaziti, s precepljanjem kolonij na nova gojišča pa smo opazili, da gliva *C. fraxinea* ni kultivabilna. Na kolonijah glive *H. howeanum* smo opazili kristalne skupke (slika 51), ki so bili nekoliko večji kot prej omenjeni skupki na kulturah glive *C. fraxinea*. Predvidevamo, da gre tudi v tem primeru za sekundarne metabolite, ki negativno vplivajo na povzročiteljico jesenovega ožiga.



Slika 50: Gliva *Hyalodendriella* sp. je že z relativno velike razdalje zavirala rast glive *C. fraxinea*

Figure 50: Fungus *Hyalodendriella* sp. suppressed growth of *C. fraxinea* from relatively big distance

Slika 51: Gliva *Hypoxyylon howeanum* je v kulturah oblikovala kristalne skupke

Figure 51: Fungus *Hypoxyylon howeanum* in cultures formed crystalline clusters

Glivi *Bjerkandera adusta* in *Biscogniauxia nummularia* sta bili edini glivi, katerih kolonije je vsaj malo preraščala glivo *C. fraxinea*. V primeru glive *B. nummularia* je bilo preraščanje oziroma vraščanje obojestransko, vendar je iz koškov gojišča, ki smo jih odvzeli iz mest preraščanj oziroma vraščanj, vedno zrasla vrsta *C. fraxinea*.

5.1.4 Individualna odpornost poljskega jesena (*F. angustifolia*)

Raziskave v nekaterih klonskih plantažah po Evropi (McKinney in sod., 2011; McKinney in sod., 2012b; Kirisits in Freinschlag, 2012) so pokazale velike razlike v odpornosti na jesenov ožig med posameznimi osebki velikega jesena (*F. excelsior*). V naših raziskavah smo velike razlike v poškodovanosti krošenj odkrili tudi med posameznimi kloni poljskega jesena (*F. angustifolia*) in po vsej verjetnosti gre tudi tu za gensko pogojeno odpornost. Mehanizmi, ki naj bi bili odločilni za večjo oziroma manjšo odpornost določenega osebka, kot kaže, niso odigrali pomembnejše vloge pri zdravstvenem stanju klonov poljskega jesena v Hraščici. Pri tem pa naj dodamo, da so na zdravje jesenov v Hraščici in najverjetneje tudi na ugotovitve naših raziskav pomembno vplivale glive iz rodu *Armillaria*.

McKinney in sod. (2012b) so ugotovili, da naj bi pri odpornosti proti jesenovemu ožigu pomembno vlogo igrali mehanizmi, ki v lesu oziroma skorji gostitelja ovirajo rast glive *C. fraxinea*. Da imajo kloni različno sposobnost zaviranja rasti patogena, smo z inokulacijskim testom dokazali tudi mi (slika 35). Ker pa je v našem testu klon, ki je imel v povprečju najbolj poškodovano krošnjo, rast glive zaviral značilno bolje od klonov, ki sta bila v povprečju precej manj poškodovana, domnevamo, da omenjeni mehanizmi v Hraščici niso tako pomembno vplivali na zdravstveno stanje klonov poljskega jesena.

Značilne razlike v dolžini nekroz med dvema različnima izolatom glive *C. fraxinea* (slika 36) potrjujejo domnevo o razlikah v patogenosti različnih osebkov glive (Bakys in sod., 2009b; Ogris, 2009). Poleg tega so bile nekroze lesa značilno daljše od nekroz skorje (slika 36), kar je v skladu z načinom kolonizacije jesenovih tkiv, ki so ga opisali Schumacher in sod. (2010).

Listje je pomembno infekcijsko mesto oziroma mesto, kjer gliva *C. fraxinea* vstopa v gostitelja (Cleary in sod., 2013b; Kirisits in sod., 2009). Rezultat okužb je med drugim pogosto tudi prezgodnje odpadanje listja in ta pojav smo opazovali tudi v semenski plantaži v Hraščici. Kloni so se med seboj precej razlikovali v intenziteti prezgodnjega odpadanja listja (slika 37), odkrili pa smo tudi pozitivno korelacijo med povprečnim deležem poškodovane krošnje in stopnjo prezgodaj odpadlega listja (slika 39). Kloni, ki so bili v povprečju bolj poškodovani, so praviloma tudi prej začeli odmetavati listje oziroma je bilo odmetavanje intenzivnejše. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi v klonski semenski plantaži velikega jesena na Švedskem (Stener, 2013), medtem ko Kirisits in Freinschlag (2012) jasne korelacije med deležem prezgodaj odpadlega listja in deležem poškodovane krošnje pri klonih velikega jesena v Avstriji nista odkrila.

Ti rezultati so na prvi pogled v nasprotju z ugotovitvami raziskav na Danskem, kjer so ugotovili negativno korelacijo med deležem poškodovane krošnje in senescenco listja v jeseni (McKinney in sod., 2011). Bolj odporni na bolezen so bili torej kloni, ki so jeseni prej odvrgli listje. Pri tem je treba opozoriti, da so v tej raziskavi senescenco listja ocenjevali na

podlagi jesenskega obarvanja listja. Ta pojav je bilo v našem delu Evrope težko opazovati tudi pred pojavom jesenovega ožiga, saj listje večinoma odpade, preden začne spremnijati barvo. Od pojava jesenovega ožiga je to odpadanje zaradi okužb listja pogosto močno pospešeno, opazovanje fenologije jesenov v jeseni pa zaradi tega praktično onemogočeno (Kirisits in Freinschlag, 2012). Nekateri raziskovalci so mnenja, da spremljanje fenologije jesenov dodatno otežuje formiranje epikormskih poganjkov (Thomsen, ustna informacija). Namesto jesenskega spremnjanja barv listja smo v Hraščici opazili drug zanimiv pojav. Nekatera drevesa, ki so bila že konec avgusta brez listja, so bila v času zadnjega popisa (12. oktober) na novo olistana, listje pa je kazalo sveže okužbe glive *C. fraxinea* (slika 38).

Na odpadlem listju oziroma listnih pecljih smo pogosto, vendar ne vedno, odkrili tipične nekroze zaradi jesenovega ožiga. Zato predvidevamo, da gliva *C. fraxinea* v Hraščicic ni bila edini dejavnik, ki je povzročil prezgodnje odpadanje listja. Prezgodnje odpadanje listja je tudi eden izmed simptomov okužbe z mraznicami (*Armillaria* spp.). Stopnjo okuženosti smo sicer natančneje ugotavljeni le za tri izbrane klone, rezultati pa kažejo pozitivno korelacijo med poškodovanostjo krošnje in okuženostjo z *Armillaria* spp. (slika 43). Stopnja okuženosti z glivami iz rodu *Armillaria* je bila večja pri klonih z bolj poškodovanimi krošnjami, kar pomeni, da bi te glive lahko pomembno vplivale tako na poškodovanost krošnje kot tudi na odpadanje listja.

Delež okužb listja, ki vodi v okužbe poganjkov in vej, je domnevno precej majhen, kar kaže na to, da zgodnje odpadanje listja dejansko lahko predstavlja nekakšen obrambni mehanizem jesenov (Kräuter in Kirisits, 2012). Kloni, ki so odvrgli listje zelo zgodaj in bili kljub temu nadpovprečno poškodovani, nakazujejo na to, da tudi ta mehanizem vedno ne deluje. To kažejo naše raziskave v Hraščici in tudi raziskave v Avstriji (Kirisits in Freinschlag, 2012). V času zadnjega popisa (12. oktober) je bilo nekaj dreves klonov, ki so imeli v povprečju najmanj poškodovane krošnje, še popolnoma olistanih, na listju pa ni bilo videti nikakršnih nekroz. To nakazuje, da bi lahko ti kloni imeli obrambne mehanizme na oziroma v listju, ki bi preprečevale začetne okužbe z glivo *C. fraxinea*. Po drugi strani bi se odporni jeseni lahko okužbam izognili s spomladanskim zgodnjim odganjanjem listja, na kar kažejo tudi raziskave na Danskem in Švedskem (McKinney in sod., 2011; Stener, 2013; Bakys in sod., 2013). Zadnje domneve nam v Harščici ni uspelo potrditi, saj nismo odkrili nobene jasne povezave med povprečno poškodovanostjo krošnje in spomladansko fenologijo jesenovih klonov (slika 41).

Listje pa ni edino vstopno mesto glive *C. fraxinea* v gostitelja. Nekroze glive *C. fraxinea* smo odkrili na korenčnikih številnih dreves. Ker v bližini nekroz ni bilo poganjkov oziroma vej z okuženim listjem, je gliva v teh primerih v drevo morala vdreti nekje drugje. Husson in sod. (2012) so mnenja, da v takih primerih gliva gostitelja okuži skozi lenticelle. Okužbe z glivo *C. fraxinea* na korenčnikih smo odkrili tudi na drevesih, katerih krošnje niso bile močno poškodovane. Deleži okuženih korenčnikov treh pregledanih klonov se niso

bistveno razlikovali (slika 43), vendar je treba poudariti, da izolacij iz vseh okuženih koreničnikov (tako s *C. fraxinea* kot tudi *Armillaria* spp.) nismo izvedli. Z izolacijami gliv iz okuženih koreničnikov v drugi raziskavi smo namreč ugotovili, da so lahko glive iz rodu *Armillaria* in gliva *C. fraxinea* skupaj prisotne v isti nekrozi. Nekateri raziskovalci menijo, da je večinoma *C. fraxinea* tista, ki povzroči primarne okužbe koreničnikov, mraznice pa se pojavijo sekundarno, vendar povzročiteljico jesenovega ožiga hitro prerastejo (Enderle in sod., 2013; Husson in sod., 2012). Pri pregledu koreničnikov v Hraščici smo nekroze s tipičnimi micelijskimi pahljačami oziroma rizomorfi pripisali glivam iz rodu *Armillaria*, nekroze brez teh znakov pa glivi *C. fraxinea*, čeprav so Enderle in sod. (2013) ugotovili, da mraznice lahko odkrijemo tudi v nekrozah, ki ne kažejo tipičnih znakov okužbe. Kakor koli, iz štirih nekroz brez znakov okužbe z mraznicami (*Armillaria* spp.) smo v naših raziskavah izolirali samo glivo *C. fraxinea*, vendar bi bilo treba za kakršne koli sklepe število odvzetih vzorcev in izolacij precej povečati. Predvidevamo, da bi v tem primeru bili deleži okužb z glivo *C. fraxinea* najverjetneje nekoliko večji. Po drugi strani pa bi z izkopavanjem korenin najverjetneje našli še več okužb z mraznicami.

Mraznice pogosto omenjajo kot sekundarne škodljive organizme na propadajočih jesenih oziroma na jesenih, ki jih je primarno prizadel jesenov ožig (Bakys in sod., 2011; Enderle in sod., 2013; Lygis in sod., 2005; Skovsgaard in sod., 2010). Omenjajo predvsem šibko patogeni vrsti *A. gallica* Marxm. & Romagn. in *A. cepistipes* Velen. V raziskavah v Litvi so okužbe z zadnjo pozitivno korelirale s poškodovanostjo krošnje (Bakys in sod., 2011). Tudi Enderle in sod. (2013) so pri jesenih z bolj poškodovanimi krošnjami odkrili več okuženih koreničnikov. Kot smo že omenili, smo do podobnih ugotovitev prišli tudi mi (slika 44). Kljub vsemu pa smo v Hraščici odkrili nekaj jesenov, ki skorajda niso kazali simptomov okužbe z jesenovim ožigom, koreničniki teh dreves pa so bili močno okuženi z mraznicami. Tudi v Nemčiji so okužene koreničnike odkrili na nekaterih drevesih z relativno zdravo krošnjo (Enderle in sod., 2013). Gliva iz rodu *Armillaria* je bila v Sloveniji sicer že določena kot primaren patogen na jesenih (Ogris in Mlinšek, 2010). Da bi mraznice lahko igrale tudi bolj primarno vlogo, je pokazala tudi determinacija vrst *Armillaria* spp. v Hraščici. V dveh primerih je šlo najverjetneje za vrsto *A. cepistipes* v enem primeru pa za glivo *A. mellea* (slika 45). Pomembna je predvsem determinacija slednje, saj je v primerjavi z *A. cepistipes* mnogo bolj primarna in velja za najbolj patogeno evropsko vrsto mraznice na listavcih (Guillaumin in sod., 1993). Vsekakor je torej pomembno, katera gliva iz rodu *Armillaria* je na določeni lokaciji prisotna, dodatno vprašanje pa je, ali se jeseni, tako kot v primeru glive *C. fraxinea*, med seboj razlikujejo tudi v dozvetnosti za okužbe z mraznicami.



Slika 52: Rovni sistemi pisanega jesenovega ličarja pod skorjo odmrlega poljskega jesena

Figure 52: Galeries of *Leperinus fraxini* under the bark of dead Narrow-leaved ash

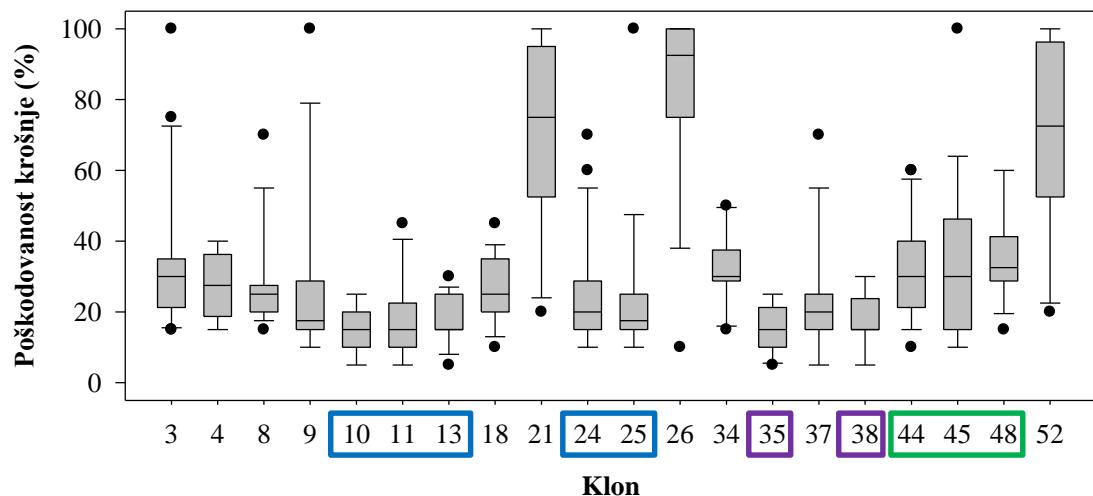
Mraznice v vsakem primeru pospešijo propad okuženega jesena. V proces propadanja jesenov pa so pogosto vključeni tudi jesenovi podlubniki, najpogosteje pisani jesenov ličar *Leperinus fraxini* Panzer (Keßler in sod., 2012; Kunca in sod., 2011; Lenz in sod., 2012). V Sloveniji smo na jesenih, ki so bili okuženi z jesenovim ožigom, le redko odkrili znake napada podlubnikov. Tudi v Hraščici smo pred letom 2012 odkrili le nekaj napadenih dreves, ki pa so bili praviloma pred napadom podlubnikov že močno oslabljeni zaradi okužb z glivami *C. fraxinea* in *Armillaria* spp. Leta 2012 pa smo na plantaži odkrili povečano število odmrlih dreves, ki so kazala tipične znake napada jesenovih podlubnikov (slika 52). Poleg tega je bilo nekaj teh dreves v prejšnjem letu še relativno zdravih in nepoškodovanih. Tudi v Avstriji ugotavljajo, da izbruhi jesenovih podlubnikov postajajo vse pogostejši (Pfister, 2012), škodljivec pa zaradi namnožitev postaja vse bolj primaren. To pomeni, da bo v prihodnje treba to vrsto intenzivneje spremljati in morda tudi zatirati.

Jesen na okužbe z jesenovim ožigom pogosto odreagirajo z oblikovanjem epikormskih poganjkov, ki vsaj na videz lahko zmanjšajo poškodovanost dreves (Kirisits in Freinschlag, 2012). K temu pripomorejo tudi dolgo odmrli poganjki in veje, ki odpadejo iz krošnje okuženih dreves. Tako virtualno izboljšanje smo pogosto opazili tudi pri posameznih drevesih v Hraščici. Vendar pa si težko predstavljamo, da bi bil to razlog za izboljšanje povprečne poškodovanosti dvanajstih klonov, ki je bilo opaženo med popisoma v letih 2011 in 2012. Podobno izboljšanje zdravstvenega stanja jesenov so opazili tudi v drugih raziskavah, kot možni vzrok pa omenjajo klimatske dejavnike (Enderle in sod., 2013; Kirisits in Freinschlag, 2012). Glede na rezultate naših raziskav vpliva temperature na glivo *C. fraxinea* bi lahko na to vplivala ekstremno vroča poletna obdobja. Na to sta opozorila tudi že Kowalski in Bartnik (2010). Krajska vročinska poletna obdobja so se pojavljala praktično vsa leta naših opazovanj v Hraščici, je pa bilo leto 2011 posebno zaradi nadpovprečno vročega septembra. Poletje je bilo tako podaljšano, kar bi lahko upočasnilo (morda celo preprečilo) kolonizacijo tkiv gostitelja. Poleg tega smo leta 2012 v Sloveniji opazili relativno

malo novih okužb z jesenovim ožigom (lastna opazovanja). To kaže na to, da so bile v času sproščanja askospor neugodne vremenske razmere za izvršitev okužb ali pa je bilo listje jesena v tem času na okužbe bolj odporno. Kakor koli, taka izboljšanja so prehodnega značaja in se bo po vsej verjetnosti poškodovanost v prihodnjih letih ponovno povečala.

V semenski plantaži v Hraščici pa so potekale tudi genetske raziskave klonov poljskega jesena. Pred kratkim objavljeni rezultati kažejo (Westergren in sod., 2013), da so nekateri kloni z različnimi oznakami identični. Izmed klonov, ki smo jih v analizo vključili v naši raziskavi, si identične genotipe delijo kloni št. 10, 11, 13, 24 in 25, prav tako kloni št. 44, 45 in 48 ter tudi klona št. 35 in 38. Če primerjamo poškodovanost krošnje v letu 2012 (slika 53), ugotovimo, da med »kloni« znotraj teh treh skupin resnično ni velikih razlik v poškodovanosti krošnje. Morda v eni skupini nekoliko izstopata klona št. 24 in 25. Tako smo npr. na podlagi prvega popisa poškodovanosti leta 2009 klon št. 10 za poskus inokulacije izbrali kot najbolj zdravega, klon št. 24 pa kot predstavnika srednje poškodovanih klonov. Značilnih razlik v dolžini nekroz po inokulaciji glive *C. fraxinea* v vejice omenjenih dveh klonov nismo odkrili (slika 35). Torej tudi ti rezultati kažejo, da bi resnično lahko šlo za identičen klon. S pregledom korenčnikov teh dveh klonov smo nato odkrili najverjetnejši razlog za razlike v poškodovanosti krošnje. Ker okužb z mraznicami na drevesih klona št. 10 nismo odkrili, okuženih dreves klona št. 24 pa je bilo več kot 30 % (slika 43), predvidevamo, da so glive iz rodu *Armillaria* vzrok teh razlik. Mraznice se širijo predvsem z rizomorfi, okužbe z njimi pa so zato bolj prostorsko odvisne kot okužbe z askosporami glive *H. pseudoalbidus*, ki jih prenaša veter (Enderle in sod., 2013). Tako lahko predvidevamo, da so v okolici dreves z oznako 24 mraznice prisotne v večjem številu ali pa so bolj agresivne kot v okolici dreves z oznako 10.

Na podlagi naših rezultatov lahko ugotovimo, da je propadanje jesenov proces, ki ga v večini primerov sproži gliva *C. fraxinea* in v katerem pomembno vlogo igrajo tudi drugi škodljivi organizmi, pomembno pa na ta proces vplivajo tudi klimatski dejavniki. Čeprav smo ugotovili značilne razlike v poškodovanosti različnih klonov in je po vsej verjetnosti odpornost na jesenov ožig resnično gensko pogojena, je treba poudariti, da je poškodovanost posledica delovanja vseh naštetih dejavnikov. Zaradi prisotnosti drugih škodljivih organizmov in nepojasnjene njihove vloge, je proučevanje odpornosti na jesenov ožig oziroma obrambnih mehanizmov gostitelja močno oteženo. Prav tako se zaradi velikega deleža okužb na korenčnikih lahko vprašamo, kdaj in kako te okužbe vplivajo na poškodovanost krošnje. Vsekakor naši rezultati kažejo na to, da ocena poškodovanosti krošnje ni dovolj in pogosto ne pokaže dejanskega povzročitelja zdravstvenega stanja ocenjevanega drevesa.



Slika 53: Delež poškodovane krošnje v letu 2012. Kloni, ki naj bi bili identični, imajo tudi podobno poškodovane krošnje. Tri skupine identičnih klonov so obarvane s tremi različnimi barvami

Figure 53: Damage crown share in 2012. Clones which are supposed to be identical are also similarly damaged. Three groups of identical clones are coloured in three different colours

5.1.5 Poškodovanost jesenov v jesenovih semenskih objektih

Rezultati popisa in tudi naša opazovanja na terenu so pokazali, da je povprečen delež odmrle krošnje na večini lokacij manj kot 20%, mortaliteta pa le nekaj odstotna. Izstopala je le lokacija Željne (slika 54), kjer je bil povprečni delež odmrle krošnje skoraj 40%, mortaliteta pa okoli 10%. Naj poudarimo, da so bili popisi narejeni v dokaj starih sestojih (78 % popisanih dreves pripada močnejšemu drogovnjaku ter tanjšemu ali močnejšemu debeljak), v semenskih objektih, ki so izbrani zaradi velike kakovosti sestojev. V mlajših sestojih bi bila delež poškodovane krošnje, predvsem pa mortaliteta najverjetneje nekoliko večja. Na to kaže tudi velika okuženost in mortaliteta jesenovega mladja, ki je bila opažena na vseh lokacijah, kjer je bilo jesenovo mladje prisotno.



Slika 54: Pogled na močno poškodovan sestoj na lokaciji Željne (zgoraj) in na manj poškodovan sestoj na lokaciji Konjiška gora (spodaj). Obe sliki sta bili posneti avgusta 2011

Figure 54: View on highly damaged ash stand at location Željne (up) and on less damaged stand at location Konjiška gora (down). Both photos were taken in August 2011

Tako kot v Hraščici smo tudi na raziskovalnih ploskvah v izbranih semenskih objektih ugotovili, da v procesu propadanja jesenov pomembno vlogo igrajo mraznice (*Armillaria* spp.). Čeprav smo za odkrivanje okužb z mraznicami preverjali samo drevesa s kakršnimi

koli poškodbami koreničnika, smo značilne micelijske pahljače oziroma rizomorfe mraznic (slika 55) odkrili na 8,5 % vseh popisanih dreves, med drugim tudi na vseh odmrlih jesenih.

Vzorcev za izolacijo gliv *Armillaria* spp. sicer nismo jemali, odvzeli smo jih le na lokaciji Kropivnica. Molekularna determinacija pridobljenih izolatov je pokazala, da gre za vrsto *Armillaria gallica* Marxm & Romagn (slika 45) in tako smo v naših raziskavah na jesenih določili še tretjo vrsto mraznice. Omenjena vrsta je sicer na velikem jesenu pri nas že bila ugotovljena (Munda, 1997). Okužbe z mraznicami so bile najpogosteje odkrite na jesenih, ki so imeli relativno bolj poškodovane krošnje, na lokaciji Brezje pa smo okužbe z omenjenimi glivami odkrili tudi na dveh jesenih, katerih krošnji nista kazali poškodovanosti zaradi jesenovega ožiga. Vzorcev iz teh dveh dreves za nadaljnjo analizo žal nismo odvzeli, tako da ne vemo, ali je te koreničnike najprej okužila *C. fraxinea* in so se mraznice pojavile sekundarno ali pa so vendarle glive iz rodu *Armillaria* odigrale primarno vlogo patogena.



Slika 55: Micelijske pahljače in rizomorfi mraznice pod skorjo odmrlega jesenega drevesa

Figure 55: Mycelia fans and rhizomorphs of honey fungi under the bark of dead ash tree



Slika 56: Pot proti slapu Peračica na lokaciji Brezje je bila že avgusta prekrita s prezgodaj odpadlim okuženim jesenovim listjem

Figure 56: Path towards Peračica waterfall at the location Brezje was already in August covered with premature shaded diseased ash leaves

Prezgodnje odpadanje listja je bilo nekoliko bolj izraženo le na lokacijah Krekovše in Brezje (slika 56). Glavni razlog za to je najverjetneje dejstvo, da so ti sestoji locirani na mestih z

veliko relativno zračno vlago. Na lokaciji Krekovše bi lahko prezgodnje odpadanje dodatno pospešila pepelovka *Phyllactinia fraxini* (DC.) Fuss, verjetno pa je razlog za nekoliko večji delež odpadlega listja tudi dejstvo, da je bil popis na tej lokaciji narejen najkasneje. Pojav jesenove pepelovke pred odpadanjem listja je sicer običajen in zaradi poznegra pojavljanja ne slabosti gostitelja. Kot smo omenili v prejšnjih poglavjih, je stopnja poškodovanosti krošnje v naslednjem letu odvisna od tega, ali se je gliva *C. fraxinea* iz okuženega listja razrasla skozi pecelj do poganjka, preden je listje odpadlo. Tako lahko rečemo, da delež prezgodaj odpadlega listja zaradi okužbe z jesenovim ožigom nakazuje na povečano poškodovanost krošnje v naslednjem letu.

Ne samo odpadanje okuženega listja, ampak tudi drugi simptomi jesenovega ožiga so na zasenčenih mestih z veliko relativno zračno vlago in nekoliko nižjimi temperaturami bolj pogosti, poškodovanost jesenov zaradi glive *C. fraxinea* pa zato večja (Ogris, 2008). Podobno so tudi krošnje jesenov, ki so bolj izpostavljene soncu in s tem višjim temperaturam ter vetru in s tem manjši zračni vlagi, manj poškodovane kot krošnje jesenov, ki tvorijo polnilni sloj sestojev. To potrjujejo tudi naši rezultati, saj je bil povprečen delež odmrle krošnje kot tudi povprečen delež prezgodaj odpadlega listja sovladajočih in obvladanih jesenov nekoliko večji od nadvladajočih in vladajočih jesenov v sestojih.

Poškodovanost jesenov zaradi jesenovega ožiga na izbranih raziskovalnih ploskvah v Sloveniji je primerljiva s poškodovanostjo jesenov na raziskovalnih ploskvah v Spodnji Avstriji (Keßler in sod., 2012). Tam popise poškodovanosti izvajajo od leta 2007. Poškodovanosti v povprečju vseskozi nekoliko narašča, vendar se na nekaterih mestih ni veliko spremenila in je ostala majhna. Kako hitro bo poškodovanost jesenov naraščala pri nas, bodo pokazali popisi v prihodnjih letih.

Podobno kot v Hraščici se je tudi na raziskovalnih ploskvah v izbranih jesenovih semenskih objektih kazala povečana odpornost posameznih osebkov jesena. Čeprav je bila gliva prisotna na vseh lokacijah, približno 13 % popisanih jesenov ni kazalo simptomov jesenovega ožiga. Ta drevesa so gotovo potencialni vir reprodukcijskega materiala za morebitno vzgojo odpornih sadik. Pri tem naj dodamo, da v primerih starejšega in debelejšega drevja odpornost, ki se kaže v naravi, ni nujno gensko pogojena in da potomci ne bodo nujno kazali podobne odpornosti. Predvidevamo, da je prav to razlog, da tudi v bližini odpornih jesenov pogosto ni bilo mogoče odkriti zdravega jesenovega mladja.

5.2 SKLEPI

5.2.1 Odgovori na zastavljene raziskovalne hipoteze

- H1: Jesenov ožig je prisoten v vseh izbranih jesenovih semenskih sestojih po Sloveniji, vendar je stopnja poškodovanosti manjša kot v državah, kjer se je bolezen pojavila prej kot v Sloveniji.

Simptome jesenovega ožiga oziroma poškodbe zaradi glive *C. fraxinea* smo odkrili v vseh izbranih semenskih sestojih. Na simptome bolezni smo bili pozorni tudi pri drugem terenskem delu in lahko z veliko gotovostjo rečemo, da je jesenov ožig prisoten na vseh rastiščih velikega in poljskega jesena pri nas.

Podatkov o poškodovanosti jesenovih sestojev zaradi glive *C. fraxinea* v Evropi ni prav veliko oziroma so zaradi različnih ocenjevalnih metod težko primerljivi z izzsledki naših raziskav. Kljub vsemu lahko rečemo, da je poškodovanost izbranih jesenovih sestojev pri nas podobna poškodovanosti jesenovih sestojev v Spodnji Avstriji (Keßler in sod., 2012). Podobna poškodovanost je razumljiva, saj so bili simptomi bolezni v Avstriji prvič odkriti le leto prej kot v Sloveniji. Vsekakor pa je poškodovanost jesenovih sestojev zaradi jesenovega ožiga pri nas veliko manjša od poškodovanosti jesenovih sestojev v nekaterih baltskih državah. Tam so zaradi jesenovega ožiga potekale velike golosečnje, ki tudi zdaj še niso končane, površine jesenovih sestojev pa so se zato v zadnjih dveh desetletjih drastično zmanjšale (Bakys, 2013; Kenigsvalde in sod., 2010; Lygis in sod., 2009). Glavni razlog za to je po vsej verjetnosti dejstvo, da je na omenjenih območjih gliva prisotna že veliko dlje, na podlagi naših raziskav pa predvidevamo, da bi lahko k manjši poškodovanosti jesenovih sestojev pri nas pripomogla tudi nekoliko toplejša klima.

- H2: Obstaja veliko število škodljivih organizmov, ki lahko prizadenejo jesene. Predvsem na najbolj prizadetih območjih so poleg glive *C. fraxinea* prisotne tudi glive iz rodu *Armillaria* in hrošči iz poddružine Scolytinae.

Naše raziskave so potrdile, da v procesu propadanja jesenov poleg glive *C. fraxinea* sodelujejo tudi drugi škodljivi organizmi. Med njimi vsekakor najpomembnejšo vlogo igrajo glive iz rodu *Armillaria*. Relativno velik delež okuženih jesenov smo odkrili tako v semenski plantaži poljskega jesena v Hraščici kot tudi v izbranih jesenovih semenskih objektih. Z molekularnimi analizami odvzetih vzorcev smo ugotovili, da v propadanju jesenov pri nas sodelujejo vrste *A. mellea*, *A. gallica* in *A. cepistipes* (slika 45). Te glive najverjetneje igrajo sekundarno vlogo, kar pomeni, da večinoma okužijo jesene, ki jih je prej oslabila gliva *C. fraxinea* oziroma drug škodljiv dejavnik. Vseeno pa opazovanja na terenu kažejo, da bi lahko

bile mraznice v nekaterih primerih tudi primarni vzrok odmiranja jesenov. Predvidevamo, da bi primarne okužbe lahko povzročala predvsem vrsta *A. mellea*. Ne glede na to, ali se glive iz rodu *Armillaria* na jesenih pojavljajo primarno ali sekundarno, pa lahko rečemo, da te glive propad okuženega jesena močno pospešijo. Ker gre za polifagne organizme, mraznice poleg jesenov (tudi tistih, ki kažejo odpornost na jesenov ožig) v gozdovih ogrožajo tudi drevesa drugih vrst, žal pa je neposredno zatiranje teh gliv v gozdovih praktično nemogoče.

V Hraščici smo iz leta v leto odkrili več odmrlih jesenov, ki so kazali znake napada jesenovih podlubnikov. Če je sprva kazalo, da se ti škodljivci pojavljajo le na močno poškodovanih oziroma odmrlih jesenih, pa smo z zadnjim popisom ugotovili, da lahko napadejo in uničijo tudi relativno zdrave osebke. Na podlagi rovnih sistemov (slika 52) predvidevamo, da jesene večinoma ogroža vrsta *Lepereshinus fraxini*, za katero velja, da je večinoma sekundarna, lahko pa tudi primarna vrsta (Jurc, 2008). Na jesenih, ki smo jih popisovali v izbranih semenskih objektih, znakov napada podlubnikov sicer nismo odkrili, smo pa napadena drevesa pogosto opazili v njihovi bližini. Kakor koli, tudi jesenovi podlubniki igrajo vse pomembnejšo vlogo v procesu propadanja jesenov, in kot vse kaže, bo treba v prihodnosti pri gospodarjenju z jesenom več pozornosti nameniti tudi spremeljanju in zatiranju teh škodljivih organizmov.

Na jesenih, ki so bili objekt našega raziskovalnega dela, smo pogosto odkrili tudi znake napada jesenovega rilčkarja (*Stereonychus fraxini*), nekoliko bolj poredko pa smo na jesenovem listju opazili jesenovo pepelovko (*Phyllactinia fraxini*). Pri drugem terenskem delu smo na jesenih pogosto opazili tudi jesenovo listno uš (*Prociphilus fraxini*) ter nekaj primerov rakavih ran, ki jih je povzročila gliva *Neonectria galligena* (Ogris in sod., 2009b).

H3: Obstajajo razlike v individualni odpornosti posameznih jesenov. Razlike so v poškodovanosti krošenj med različnimi kloni, poleg tega pa odpornejši kloni spomladji prej olistajo, jeseni prej odvržejo listje in bolje zavirajo rast patogena v svojih tkivih.

Razlike v poškodovanosti posameznih osebkov jesena smo odkrili v jesenovih semenskih objektih kot tudi na semenski plantaži poljskega jesena, kjer smo odpornost na jesenov ožig tudi bolj natančno proučevali. Značilne razlike v deležu poškodovane krošnje med posameznimi kloni kažejo na to, da so nekateri osebki jesena resnično bolj odporni na bolezen in da gre za gensko pogojeno odpornost. Vseeno pa je treba dodati, da so na plantaži jesene ogrožali tudi drugi škodljivi organizmi (predvsem glive iz rodu *Armillaria* in jesenovi podlubniki), katerih vloga v procesu propadanja jesenov še ni povsem razjasnjena. Prav zato je mogoče bolje reči, da so določeni osebki poljskega jesena v Hraščici bolj odporni na

delovanje kompleksa več škodljivih organizmov, ki sodelujejo v procesu propadanja jesenov.

Z inokulacijami glive *C. fraxinea* v vejice treh različnih klonov smo dokazali, da nekateri jeseni v svojih tkivih resnično bolje zavirajo rast patogena. Ker je rast glive najbolje zaviral klon, ki je imel v povprečju najbolj poškodovano krošnjo, ne moremo potrditi hipoteze tujih raziskovalcev, da odpornejši kloni bolje zavirajo rast patogena v okuženih tkivih. Na podlagi naših rezultatov bi torej lahko rekli, da mehanizmi, ki zavirajo rast patogena v gostiteljevih tkivih, niso igrali odločilne vloge za zdravje klonov poljskega jesena v Hraščici. Z našimi raziskavami v Hraščici pa nam tudi ni uspelo potrditi hipotez, da so na jesenov ožig odpornejši jeseni, ki spomladi prej odženejo oziroma jeseni prej odvržejo listje. Pri tem je ponovno treba opozoriti na druge škodljive organizme, ki so bili prisotni na jesenih v Hraščici, saj predvidevamo, da so pomembno vplivali na ugotovitve naših raziskav.

Individualna odpornost jesenov na jesenov ožig torej resnično obstaja, potrebne pa so nadaljnje raziskave, da ugotovimo oziroma potrdimo obrambne mehanizme, ki so odločilni za to odpornost.

H4: S primernim topotno obdelavo okuženih jesenovih sadik gliva *C. fraxinea* v okuženih tkivih odmre in sadika preživi.

Z obdelavo okuženih sadik in poganjkov velikega jesena v topli vodi smo dokazali, da 10-urna segrevanja pri 36 oziroma 40 °C povzročijo popolno eradikacijo glive *C. fraxinea* v okuženih jesenovih tkivih, pri čemer se preživetje topotno obdelanih sadik ni bistveno zmanjšalo. Ti rezultati kažejo na možnost razvoja metode topotne obdelave za zatiranje glive *C. fraxinea*. Uporaba take metode bi bila najverjetneje omejena le na obdelave pred premeščanjem reprodukcjskega materiala na neokužena območja.

H5: Tudi v naravi se lahko razvijejo topotne razmere, ki ogrožajo preživetje glive *C. fraxinea*.

Peturna segrevanja v vodi pri 36 °C so močno zmanjšala kultivabilnost glive *C. fraxinea* v okuženih jesenovih tkivih. Z merjenjem temperature na sadikah velikega jesena v Ljubljani smo dokazali, da se poleti podobne temperaturne razmere lahko razvijejo tudi v naravnem okolju. Predpogoj za to je sicer zadostna izpostavljenost soncu, vseeno pa lahko na podlagi teh rezultatov predvidevamo, da je v vročih poletnih obdobjih v naših podnebnih razmerah razvoj jesenovega ožiga precej oviran.

H6: Med kemičnimi sredstvi, ki se uporablajo za zatiranje sorodnih gliv, je tudi sredstvo, ki uspešno zatira glivo *C. fraxinea* v kulturi.

Med izbranimi aktivnimi snovmi, ki se sicer uporablajo za zatiranje nekaterih drugih gliv iz reda Helotiales, sta rast glive *C. fraxinea* v kulturi zelo učinkovito zatirala predvsem snovi prokloraz in karbendazim. Predvsem slednja je učinkovito ovirala tudi razvoj apotecijev patogena na okuženih jesenovih pecljih. Laboratorijske rezultate je treba preveriti še v naravnem okolju, pri tem pa se moramo zavedati, da bo tudi v primeru zadovoljivih rezultatov uporaba fungicidov zelo omejena. Za zatiranje jesenovega ožiga naj bi bili najbolj smiselní ukrepi, ki bi zmanjševali inokulum oziroma ki bi preprečili razvoj apotecijev teleomorfa *H. pseudoalbidus*. Rezultati naših raziskav kažejo, da bi to lahko dosegli s primernimi nanosi uree.

H7: Obstaja antagonizem med glivo *C. fraxinea* in določenimi drugimi glivami, ki jih je mogoče izolirati iz poškodovanih jesenov.

Gliva *C. fraxinea* je bila v dvojnih kulturah večinoma v podrejenem položaju, saj je kar 13 od 19 testiranih gliv bolj ali manj uspešno preraščalo kolonije povzročiteljice jesenovega ožiga. Še dve dodatni glivi sta s kolonijami glive *C. fraxinea* tvorili inhibicijske cone. Le v dveh primerih je v kolonije drugih gliv vraščala oziroma jih preraščala gliva *C. fraxinea*. Glede na to, da smo te glive izolirali iz jesenovih tkiv, ki so kazali simptome okužb z jesenovim ožigom, predvidevamo, da vsaj nekatere izmed njih igrajo vlogo naravnega sovražnika. Nadaljnje raziskave so potrebne, da bi ugotovili, ali bi se dalo katero izmed njih uporabiti tudi za intenzivnejše in bolj usmerjeno biološko zatiranje jesenovega ožiga. Na podlagi naših opazovanj še največ možnosti pripisujemo glivi *Hypocrea* sp. (anamorf *Trichoderma* sp.), ki je izredno hitro popolnoma prerasla kolonije glive *C. fraxinea* in zaustavila njihovo rast. Glive iz rodu *Trichoderma* se tudi sicer pogosto uporablajo za zatiranje številnih patogenih gliv.

5.2.2 Gospodarjenje z jesenom v prihodnje

Jesenov ožig pri nas že povzroča veliko škode, populacije velikega jesena (*F. excelsior*) in poljskega jesena (*F. angustifolia*) pa so močno ogrožene. Rezultati naših raziskav kažejo na to, da sicer obstajajo možnosti za razvoj različnih metod zatiranja povzročiteljice jesenovega ožiga, vendar se je treba zavedati, da je uporaba teh metod v gozdu zelo omejena. Da bi zagotovili obstoj obeh vrst jesenov v naših gozdovih, so zato potrebni drugi ukrepi.

Glede na izsledke dosedanjih raziskav in tudi rezultate našega raziskovalnega dela bi lahko rešitev za evropske populacije velikega in poljskega jesena predstavljal individualna

odpornost, ki jo kažejo posamezni osebki jesena. Predvideva se, da bo gliva *C. fraxinea* povzročila veliko naravno selekcijo, ostalo naj bi le majhno število odpornih osebkov. Kako velika bo ta populacija odpornih jesenov, pa je v veliki meri odvisno od našega gospodarjenja v prihodnje.

Gospodarjenje v jesenovih gozdovih mora biti zato usmerjeno v iskanje odpornih in vitalnih osebkov, ki se jih nato s primernimi ukrepi pospešuje in neguje. Kot kažejo rezultati naših raziskav, moramo biti pri iskanju odpornejših osebkov pozorni tako na zdravstveno stanje krošnje kot tudi okužbe korenčnikov. Zelo pomembno je tudi, da s pravočasno sanitarno sečnjo preprečimo razvoj oziroma namnožitev drugih škodljivih organizmov, ki bi lahko ogrozili izbrana odporna drevesa. Ta bodo vir semena za naravno pomlajevanje sestojev, pa tudi vir reprodukcijskega materiala za vzgojo odpornih sadik. Obnova gozda s sajenjem sadik velikega in poljskega jesena se namreč ne bo izvajala, dokler ne bodo vzgojene za okužbo z jesenovim ožigom odpornejše sadike (Grečs in sod., 2012). Pomembna naloga čaka torej tudi drevesničarje, saj bi s sajenjem odpornih sadik lahko močno pospešili proces obnove jesenovih sestojev, zmanjšanje številnosti populacij omenjenih vrst jesenov zaradi jesenovega ožiga pa bi bilo precej šibkejše. Glede na to, da glivi *C. fraxinea* toplejša in sušnejša klima ne ustreza, jeseni pa takšne razmere relativno dobro prenašajo (Percival in sod., 2006; Scherrer in sod., 2011), gre morda pričakovati, da bi lahko bil uspeh omenjenih ukrepov večji na nekoliko toplejših in sušnejših rastiščih.

Kljub temu, da je bolezen razširjena skoraj po vsej Evropi, moramo preprečiti morebitne nove vnose različnih sevov patogena v Evropo in s tem zmanjšati možnosti za nastanek še bolj virulentnih osebkov glive (Gross in sod., 2014). Na koncu naj še omenimo, da moramo nadaljevati in morda še intenzivneje izvajati ukrepe za preprečevanje vnosa tujerodnih (škodljivih) organizmov v Slovenijo. Jesenom namreč že preti nova grožnja, in sicer jesenov krasnik (*Agrilus planipennis* Fairmaire). Ta vrsta hrošča, ki izvira iz Vzhodne Azije, je bila pred približno dvema desetletjema vnesena v Severno Ameriko, kjer zdaj povzroča velikansko ekonomsko in ekološko škodo ter močno ogroža obstoj tamkajšnjih vrst jesenov. V zadnjem desetletju se je ta škodljivec pojavit tudi v Moskvi, zdaj pa se počasi širi in približuje drugim evropskim državam (Baranchikov in sod., 2008).

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Jesenov ožig je bolezen, ki v zadnjih dveh desetletjih močno ogroža populacije velikega jesena (*Fraxinus excelsior*) in poljskega jesena (*F. angustifolia*) v Evropi. Povzročiteljica bolezni je gliva *Chalara fraxinea* (teleomorf *Hymenoscyphus pseudoalbidus*), ki je bila v Evropo najverjetneje vnesena iz Azije. Gliva povzroča različne simptome, okuži lahko praktično vsa tkiva svojih gostiteljev, končni rezultat okužbe pa je odmiranje krošnje in zelo pogosto odmrtje celotnih dreves.

V Sloveniji smo prve simptome bolezni opazili jeseni leta 2006, v naslednjih dveh letih pa se je bolezen razširila na območje celotne države. Prvi namen naših raziskav je bil oceniti poškodbe, ki jih gliva *C. fraxinea* povzroča pri nas. V ta namen smo avgusta leta 2011 na lokaciji devetih jesenovih semenskih objektov postavili trajne raziskovalne ploskve in opravili prvi popis poškodovanosti. Na vsaki lokaciji smo 30 jesenom ocenili delež odmrle krošnje in delež predčasno odpadlega listja zaradi okužb z glivo *C. fraxinea*. Povprečni delež odmrle krošnje je bil na različnih lokacijah med 7,2 in 38,7 %. Mortaliteta je bila v povprečju 1,9 %, na najbolj prizadeti lokaciji pa je dosegla 10 %. Povprečni delež prezgodaj odpadlega listja je bil precej majhen in je znašal le 2,7 %. Prezgodnje odpadanje listja je bilo nekoliko bolj izraženo le na dveh lokacijah z nekoliko večja zračno vlogo. Čeprav nismo sistematično pregledovali korenčnikov dreves, smo na 8,5 % popisanih jesenov odkrili tudi okužbe z mraznicami (*Armillaria* spp.).

Opazovanja na terenu so pokazala, da so poškodbe na jesenih zaradi jesenovega ožiga večje na mestih z večjo zračno vlogo in relativno nižjimi temperaturami. To kaže na to, da temperatura pomembno vpliva na razvoj bolezni. Vpliv temperature na glivo *C. fraxinea* smo najprej proučevali z gojenjem glive pri različnih temperaturah (5, 10, 15, 20, 22, 25, 28 in 30 °C). Ugotovili smo, da so optimalne temperature za rast glive nekje med 20 in 22 °C, medtem ko rasti glive pri temperaturah 28 in 30 °C nismo opazili. Na podlagi teh rezultatov smo se odločili, da testiramo toleranco glive do še nekoliko višjih temperatur. Najprej smo kulture glive *C. fraxinea* eno, dve, štiri, osem, 16 oziroma 24 ur segrevali pri temperaturah 34, 36, 38, 40, 42 in 44 °C, nato pa smo s precepljanjem segrevanih kultur na sveža gojišča preverjali kultivabilnost glive. Rezultati so pokazali, da so rast glive iz precepljenih koščkov popolnoma preprečila 24-urna segrevanja pri 38 °C, 16- in 24-urne obdelave pri 40 °C, štiri- in več-urna segrevanja pri 42 °C in vse obdelave pri 44 °C.

Nadaljevali smo z raziskavami tolerance glive *C. fraxinea* do višjih temperatur v tkivih gostitelja. Da bi preverili možnosti za razvoj metode topotnega zatiranja patogena, smo istočasno proučevali vpliv istih temperatur na preživetje sadik velikega jesena (*F. excelsior*). V sklopu teh raziskav smo sicer naredili tri poskuse, za predstavitev rezultatov pa sta

pomembna predvsem zadnja dva. V teh dveh poskusih smo v posebej opremljeni kadi v vodi segrevali na videz zdrave sadike in okužene poganjke velikega jesena. Rastlinski material smo pet oziroma 10 ur namakali v vodi pri temperaturi 36, 40 oziroma 44 °C. Po obdelavi smo okužene poganjke uporabili za izolacije gliv, sadike pa smo posadili na vrtu GIS, kjer smo spomladi ugotavliali njihovo preživetje. Glivo *C. fraxinea* nam je uspelo izolirati le iz 15 oziroma 2,5 % poganjkov, ki smo jih pet ur segrevali pri 36 oziroma 40 °C, medtem ko je bila uspešnost izolacije iz neobdelanih poganjkov več kot 90 %. Vsa ostala segrevanja so popolnoma preprečila izolacijo patogena iz okuženih obdelanih poganjkov. Visoka stopnja preživetja sadik po obdelavah pri 36 oziroma 40 °C kaže na možnosti razvoja toplotne metode za zatiranje jesenovega ožiga. Uporaba takšne metode bi bila smiselna predvsem pred premeščanjem sadilnega materiala na neokužena območja.

Peturno segrevanje okuženih poganjkov pri 36 °C je torej močno zmanjšalo preživetje glive *C. fraxinea* v tkivih gostitelja. V zadnjem delu raziskav vpliva temperature na glivo *C. fraxinea* nas je zato zanimalo, kakšne toplotne razmere se v gostiteljskih tkivih v naravi pojavijo v toplejšem delu leta. Štiri sadike velikega jesena (*F. excelsior*) smo zato opremili s temperaturnimi senzorji, ki so merili temperaturo ob, na oziroma v sadikah med 6. julijem in 15. septembrom 2011. Ugotovili smo, da poleti temperature v tkivih gostitelja lahko za več ur presežejo 36 °C, pri čemer so maksimalne izmerjene temperature presegle celo 42 °C. Predpogoj za razvoj takih temperaturnih razmer je sicer izpostavljenost soncu, kljub temu pa ti rezultati kažejo, da je razvoj jesenovega ožiga v naših podnebnih razmerah v času vročih poletnih obdobij po vsej verjetnosti precej oviran.

V laboratorijske raziskave vpliva fungicidov na rast kultur glive *C. fraxinea* oziroma na oblikovanje apotecijev teleomorfa *H. pseudoalbidus* smo vključili osem fungicidov, ki se sicer uporabljajo za zatiranje patogenov iz reda Helotiales. Testirali smo sredstva z aktivnimi snovmi iprodion, fenheksamid, pirimetanil, kaptan, tiram, klorotalonil, prokloraz in karbendazim. Tako rast glive kot tudi oblikovanje apotecijev sta najučinkoviteje zavirali aktivni snovi s sistemičnim delovanjem, karbendazim in prokloraz. Ker se zdi obdelava okuženega listja še najbolj smiseln ukrep zatiranja jesenovega ožiga, smo v te poskuse vključili tudi ureo. Ta snov se npr. uporablja za obdelavo listja jablan in češenj, s čimer zmanjšujejo količino inokuluma gliv *Venturia inaequalis* in *Blumeriella jaapii*. Naši rezultati kažejo, da bi lahko učinkovito zatirala tudi jesenov ožig, saj je že 24-urno namakanje okuženih pecljev v 0,25 % raztopini uree popolnoma preprečilo nastanek apotecijev. Ta sredstva je seveda treba testirati še v praksi. Tudi če se bodo izkazala za učinkovita, pa se je treba zavedati, da bo zaradi negativnih vplivov na okolje njihova uporaba precej omejena.

Glivo *C. fraxinea* v okuženih jesenovih tkivih domnevno pogosto premagajo in nadomestijo druge glive. To so potrdile tudi naše raziskave, saj smo z izolacijami iz simptomatičnih jesenovih tkiv pridobili tudi številne izolate drugih gliv. Tudi poskus gojenja patogena v

dvojnih kulturah z omenjenimi drugimi glivami je potrdil, da gliva *C. fraxinea* relativno slabo konkurira drugim glivam. Kar 13 od 19 testiranih gliv je v tem poskusu bolj ali manj uspešno preraščalo oziroma vraščalo v kolonije glive *C. fraxinea*. Relativno učinkovito preraščanje so pokazale predvsem glive, ki smo jih iz jesenovih tkiv izolirali najpogosteje (*Phomopsis* sp. 1, *Phomopsis* sp. 2, *Diapothe viticola* in *Alternaria alternata*). To kaže na to, da te glive opravljam vlogo naravnega sovražnika povzročiteljice jesenovega ožiga. Podobno bi lahko trdili tudi za glivi *Fusarium* sp. in *Eppicoccum nigrum*, ki sta v naši raziskavi v dvojnih kulturah z glivo *C. fraxinea* oblikovali inhibicijsko cono. Najučinkoviteje je sicer kolonije patogena preraščala gliva *Hypocrea* sp. (anamorf *Trichoderma* sp.). Glive iz rodu *Trichoderma* se pogosto uporabljajo za zatiranje različnih patogenih gliv in morda prav te glive predstavljajo najboljšo možnost za biotično zatiranje jesenovega ožiga.

Naše raziskave torej kažejo na različne možnosti zatiranja glive *C. fraxinea*. Zaradi prepovedi uporabe kemičnih sredstev v gozdu, velike razširjenosti bolezni in velikega infekcijskega potenciala glive *C. fraxinea* je uporaba teh zatiralnih metod precej omejena, uspešnost teh ukrepov pa precej vprašljiva. Upanje za obstoj jesenov v naših gozdovih nam tako daje predvsem ugotovljena individualna odpornost posameznih jesenov. Tuje raziskave so pokazale, da je odpornost gensko pogojena, da so odpornejši jeseni, ki spomladi prej olistajo oziroma jeseni prej odvržejo listje, in da odpornejši jeseni bolje zavirajo rast patogena v okuženih tkivih. Vse objavljene raziskave so bile narejene na velikem jesenu (*F. excelsior*), mi pa smo individualno odpornost raziskovali v klonskem nasadu poljskega jesena (*F. angustifolia*) v Hraščici.

S popisi poškodovanosti krošenj smo odkrili velike razlike v poškodovanosti posameznih klonov. Povprečni delež poškodovane krošnje posameznih klonov je v letu 2009 variiral med 13,2 in 53,4 %, v letu 2010 med 13,5 in 63,8 %, v letu 2011 med 16,5 in 78,8 % in v letu 2012 med 14,2 in 83,8 %. Ti rezultati kažejo, da gensko pogojena odpornost obstaja tudi v primeru poljskega jesena. Z inokulacijami glive *C. fraxinea* v vejice treh različno poškodovanih klonov smo dokazali, da nekateri osebki resnično bolje zavirajo rast glive v okuženih tkivih kot drugi. Ker je rast glive najbolje zaviral najbolj poškodovan klon, predvidevamo, da ta obrambni mehanizem ne igra vedno odločilne vloge za zdravje jesenov. Konec aprila 2012 smo popisovali razvitost brstov. Odkrili smo značilne razlike med posameznimi kloni, vendar jasne povezave s povprečno poškodovanostjo krošnje nismo odkrili. Popisi odpadanja listja, ki smo jih izvedli avgusta, septembra in oktobra 2011, so prav tako pokazali značilne razlike med posameznimi kloni, poleg tega pa smo odkrili tudi pozitivno korelacijo med stopnjo odpadanja listja in povprečnim deležem poškodovane krošnje posameznih klonov. Bolj poškodovani kloni so torej v povprečju prej odvrgli listje. Ti rezultati so sicer v nasprotju z ugotovitvami drugih raziskovalcev, vseeno pa potrjujejo, da listje kot glavno vstopno mesto glive v gostitelja igra pomembno vlogo v razvoju bolezni. Naj dodamo, da so na rezultate naših raziskav najverjetneje pomembno vplivale glive iz rodu

Armillaria. Domnevamo, da so se večinoma pojavljale sekundarno, v določenih primerih pa bi mraznice lahko bile tudi primarni vzrok propadanja jesenov. Kakor koli, za razjasnitev vloge mraznic in drugih organizmov v procesu propadanja jesenov, pa tudi za razjasnitev obrambnih mehanizmov, ki omogočajo večjo odpornost posameznih jesenov na jesenov ožig, so potrebne dodatne raziskave. Pri pregledih korenčnikov smo odkrili tudi okužbe z glivo *C. fraxinea*, ki so kazali na to, da patogen ne vstopa v svojega gostitelja le skozi listje. Domnevno se okužbe spodnjega dela debla lahko izvršijo skozi lenticelle na korenčniku oziroma nadzemnih delih korenin. Te ugotovitve kažejo, da je za oceno zdravstvenega stanja jesenov treba pregledovati celotna drevesa in ne samo krošnje.

Popise poškodovanosti krošnje v Hraščici smo naredili v letih od 2009 do 2012. Povprečni delež poškodovane krošnje se je povečal z začetnih 25,6 % v letu 2009 na 28,1 % v letu 2010 oziroma 32,0 % v letu 2011. Med popisoma v letih 2011 in 2012 povečanja poškodovanosti ni bilo, kar 12 od 20 klonov pa je bilo leta 2012 v povprečju bolje ocenjenih kot leta 2011. Predvidevamo, da so glavni razlog za to vremenske razmere, ki glivi *C. fraxinea* niso ustrezale. Smo pa leta 2012 v primerjavi s prejšnjimi popisi odkrili povečano število odmrlih jesenov, ki so kazali znake napada jesenovih podlubnikov. Ti sekundarni škodljivci, ki v določenih razmerah lahko postanejo primarni, torej predstavljajo dodatno grožnjo jesenom. V prihodnosti bo večjo pozornost tako najverjetneje treba nameniti tudi spremljanju in zatiranju teh organizmov.

Propadanje jesenov je torej kompleksen proces, na katerega vplivajo različni dejavniki. Glavni povzročitelj je gliva *C. fraxinea*, drugi škodljivi organizmi (npr. mraznice in jesenovi podlubniki) močno pospešijo, neustrezne vremenske razmere za razvoj patogena pa nekoliko upočasnijo proces propadanja jesenov. Bistvena za obstoj jesenov v naših gozdovih je ugotovljena individualna odpornost. Gospodarjenje v jesenovih sestojih mora zato biti usmerjeno v iskanje odpornih in vitalnih osebkov. Te osebke je treba negovati in pospeševati, pomembno pa je tudi, da s pravočasno sanitarno sečnjo poškodovanih in oslabljenih jesenov preprečimo razvoj oziroma namnožitev drugih škodljivih organizmov. Gre torej za pospešen proces naravne selekcije, s katerim naj bi zagotovili zadostno število odpornih dreves, ki bodo v prihodnosti omogočila naravno obnovo jesenovih sestojev. Ta drevesa bodo predstavljala tudi vir reproduksijskega materiala za vzgojo odpornih sadik, s katerimi bi naravni proces obnove jesenovih sestojev lahko precej pospešili.

6.2 SUMMARY

In the last two decades, populations of common ash (*Fraxinus excelsior*) and narrow-leaved ash (*F. angustifolia*) in Europe have been seriously threatened by the ash dieback disease. Causal agent of the disease is the fungus *Chalara fraxinea* (teleomorph: *Hymenoscyphus pseudoalbidus*), which was most likely introduced to Europe from Asia. The fungus causes different symptoms, it can colonise practically all host tissues, and the end result of the infection is dieback of crowns and often whole trees.

In Slovenia, the symptoms of ash dieback were first observed in autumn of 2006. Over the next two years, the disease has expanded throughout the country. The first aim of our research work was to evaluate the damage caused by *C. fraxinea* fungus in Slovenian forests. Therefore, monitoring plots at nine ash seed collecting stands were established and first crown damage assessments were performed in August of 2011. At each location, 30 ash trees were selected for dead crown share assessments and also the share of prematurely shaded leaves was evaluated. Mean dead crown share at different locations varied between 7.2 and 38.7%. At the most severely damaged location mortality reached 10%, otherwise mean mortality was 1.9%. Mean share of prematurely shed leaves was evaluated to only 2.7%. Premature leaf shedding was slightly more pronounced at two locations with higher air humidity. Although root collars of trees were not systemically inspected, infections with *Armillaria* spp. were found on 8.5% of selected trees.

Field observations showed that severity of the disease appears to be higher in sites with higher relative air humidity and relatively lower temperatures. This indicates that temperature importantly affects development of ash dieback. The effect of temperature on *C. fraxinea* was firstly investigated with the cultivation of fungus at different temperatures (5, 10, 15, 20, 22, 25, 28 and 30 °C). We found the temperature interval of 20–22 °C to be optimal for fungal growth. No fungal growth was observed at 28 and 30 °C. Based on that, we decided to test heat tolerance of fungus to slightly higher temperatures. *C. fraxinea* cultures were therefore exposed to selected temperature (34, 36, 38, 40, 42 and 44 °C) for one, two, four, eight, 16 and 24 hours. After the treatments the heated cultures were subcultured to fresh growth media to determine cultivability of the fungus. The subculturing was not successful after the 24-hour heating at 38 °C, after the 16- and 24-hour heating at 40 °C, after the 4-hour or longer treatments at 42 °C and after all treatments at 44 °C.

The next step was to explore heat tolerance of *C. fraxinea* to higher temperatures in the host tissues. To investigate possibilities for the development of heat treatment as an eradication method for the pathogen, effect of the same temperatures to the common ash saplings (*F. excelsior*) was also explored. Three experiments were performed in the context of this research, however the last two are more appropriate for the presentation of results. In those two experiments, healthy looking saplings and diseased shoots were water heated in

specially equipped bathtub. Plant material was soaked in heated water (36, 40 or 44 °C) for five and 10 hours. After the heat treatments, the shoots were used for fungal isolations, and the saplings were planted in the field, where their survival was identified in spring. Fungus *C. fraxinea* was successfully isolated only from 15 and 2.5% of shoots, which were treated for 5 hours at 36 and 40 °C, respectively. Isolation success from control (untreated) shots was more than 90%. All other treatments completely prevented isolation of pathogen from heated shoots. High survival rate of saplings after treatments at 36 and 40°C indicate possibilities for the development of a *C. fraxinea* eradication method. Such method would be useful before the transport of planting material to the disease free areas.

5-hour heat treatment of diseased shoots at 36 °C significantly decreased survival rate of *C. fraxinea* in host tissues. In the last part of our research work regarding the effect of temperature on *C. fraxinea*, we wanted to explore the thermal conditions in host tissues that occur naturally in the warmest part of the year. Four common ash saplings were therefore equipped with temperature sensors, which measured the temperatures around, on and in the saplings between 6th of July and 15th of September 2011. Measurements showed that the summer temperature in the host tissues can exceed 36 °C for several hours, wherein maximal temperature can go up to 42 °C and more. Exposure to the sun is a precondition for the development of such thermal conditions. However, these results indicate that hot summer weather periods in our climatic conditions can probably significantly obstruct ash dieback development.

Eight fungicides, proven effective against some pathogens from Helotiales order, were included in laboratory experiments on the effect of different chemicals on the growth of *C. fraxinea* cultures and on the development of *H. pseudoalbidus* apothecia. Products with active ingredients iprodion, fenhexamid, pyrimethanil, captan, thiram, chlorothalonil, prochloraz and carbendazim were tested. Both fungal growth and apothecia development were most efficiently inhibited by carbendazim and prochloraz. As treatments of diseased leaves seem to be the most reasonable measure against ash dieback, urea was also included in our test. Treatments of apple and cherry leaves with urea for example efficiently decrease inoculum amount of fungi *Venturia inaequalis* and *Blumeriella jaapii*. In our test, a 24-hour treatment of infected leaf petioles in 0.25% urea solution was sufficient to completely prevent apothecia development. Therefore we assume that urea could be useful also for control of ash dieback. Further testing of these substances in practice is necessary. However, even if they prove to be effective, their use will be rather limited because of their negative impacts on the environment.

Fungus *C. fraxinea* in infected host tissue is presumably often defeated and replaced by other fungi. Many isolates of other fungi obtained with fungal isolations from symptomatic ash tissues in our research confirmed that assumption. Furthermore, our test with dual cultures showed that *C. fraxinea* competes very poorly with other fungi. *C. fraxinea* colonies were

more or less successfully ingrown or overgrown by 13 out of 19 fungi tested. Ash dieback pathogen was very efficiently overgrown particularly by the most often isolated other fungi (*Phomopsis* sp. 1, *Phomopsis* sp. 2, *Diapothe viticola* in *Alternaria alternata*) from diseased ash tissues in our research. These observations indicate that listed fungi probably play a role of ash dieback biocontrol agents. Same could be said also of fungi *Epicoccum nigrum* and *Fusarium* sp., which in dual cultures with *C. fraxinea* formed an inhibition zone. However, *C. fraxinea* colonies were the most effectively overgrown by fungus *Hypocrea* sp. (anamorph *Trichoderma* sp.). Fungi from genus *Trichoderma* are often used for suppression of different plant pathogens and perhaps these fungi are also the best option for the biological control of ash dieback.

Results of our research showed different possibilities for the control of ash dieback. However, the use of chemicals in the forests is not allowed. Furthermore, the disease is widely distributed and the infection potential of fungi *C. fraxinea* is high. Therefore, the use of all these control methods is quite limited and the success of these measures is highly questionable. However, resistance of individual ash trees still gives hope for the existence of ash in our forests in the future. Foreign research showed that this resistance is genetically controlled, that more resistant ash trees flush earlier in spring and shed their leaves earlier in autumn and also that ashes with higher resistance effectively obstruct growth of the pathogen inside the host tissue. All published research work on individual resistance to ash dieback so far was done with common ash (*F. excelsior*), while our research work was done in the clonal plantation of narrow-leaved ash (*F. angustifolia*) in Hraščica.

Crown damage assessment showed significant difference in damage between individual clones. Mean crown damage share of individual clones in 2009 varied between 13.2 and 53.4%, in year 2010 between 13.5 and 63.8%, in 2011 between 16.5 and 78.8% and in year 2012 between 14.2 and 83.8%. These results showed that genetically controlled resistance to ash dieback exists also in the case of narrowed-leaved ash. With the inoculations of *C. fraxinea* fungus into the twigs of three different damaged clones we have proven that some ashes actually inhibit pathogen's growth in the host tissues more efficiently than others. However, the most damaged clone inhibited growth of *C. fraxinea* the most efficiently, therefore we assume that this defence mechanism may not be always the most important factor for the health status of ash trees. Bud development rate assessment was done in the end of April 2012. We found significant differences among different clones, but no clear correlation between mean bud development rate and mean crown damage was found. Leaf shedding assessments, performed in August, September and October 2011, also showed significant difference among clones. Furthermore, we found positive correlation between mean leaf shedding rate and mean crown damage share. In average, the more damaged clones shed their leaves earlier. These results are contrary to findings of other researchers, but still indicate that leaves, as an important infection point, could play the decisive role in ash dieback development. It is noteworthy that *Armillaria* fungi could have affected the results

of our research in Hraščica significantly. We assume, that honey fungi mostly played a secondary role, but in some cases these fungi could be the primary reason for the death of ash trees. However, further researches are needed to clarify the role of *Armillaria* spp. in the process of ash decline and also to clarify defence mechanisms responsible for the resistance of some ash trees. *C. fraxinea* root collar infections showed that leaves are not the only entry point of the pathogen into the host. In such cases, fungus presumably enters the host via lenticels on root collars and major aerial roots. All these findings suggest that not just crown damage assessments, but also inspections of whole trees are needed for a proper evaluation of ash trees health status.

Crown damage assessments in Hraščica were performed in four consecutive years from 2009 to 2012. Mean crown damage share increased from 25.6% in 2009 to 28.1% in 2010 and to 32.0% in 2011. There was no increase in mean crown damage share between assessments in 2011 and 2012, and 12 of 20 selected clones were in average assessed better in 2012 than in the year before. We assume that the major reason for such improvement were unsuitable weather conditions for the development of ash dieback. However, compared to previous assessments, we found a higher number of dead ash trees with signs of ash bark beetle attack in 2012. These secondary pests, which can in suitable conditions became primary, are an additional threat to ash trees. In the future it will therefore probably be necessary to monitor and control also these harmful organisms.

Ash decline is therefore a complex process, affected by different factors. The main cause of that decline is the invasive fungus *C. fraxinea*. Other harmful organisms (for example, *Armillaria* spp. and Scolytinae) speed up the process, while unsuitable climatic conditions for the development of ash dieback slow down the process of ash decline. Resistance of individual ash trees is crucial for the existence of ash in our forests. Management in ash stands must be focused on finding resistant ash trees. Furthermore, silvicultural measures to promote these trees need to follow. Timely sanitary loggings of highly damaged ash trees are also necessary to prevent the development of secondary pests. In fact, accelerated and controlled process of natural selection is needed to provide a sufficient number of resistant trees, which will in future serve as a source for natural regeneration of ash stands. However, resistant trees need to serve also as a source of breeding material for the production of resistant ash saplings. Planting the latter could significantly accelerate natural regeneration process.

7 VIRI

- Agrios G. N. 1997. Plant pathology. 4th edn. San Diego, Academic Press: 635 str.
- Akilli S., Ulubaş Serçe Ç., Katırcioğlu Y. Z., Maden S. 2013. Phytophthora dieback on narrow leaved ash in the Black Sea region of Turkey. Forest Pathology, 43, 3: 252–256
- Andersson P. F., Bengtsson S., Cleary M., Stenlid J., Broberg A. 2013. Viridin-like steroids from *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. Phytochemistry, 86: 195–200
- Andersson P. F., Bengtsson S., Stenlid J., Broberg A. 2012. B-norsteroids from *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. Molecules, 17: 7769–7781
- Andersson P. F., Johansson S. B. K., Stenlid J., Broberg A. 2010. Isolation, identification and necrotic activity of viridiol from *Chalara fraxinea*, the fungus responsible for dieback of ash. Forest Pathology, 40: 43–46
- Ash species in Europe: biological characteristics and practical guidelines for sustainable use. 2005. UK, Oxford Forestry Institute, University of Oxford: 128 str.
- Bakys R. 2013. Dieback of *Fraxinus excelsior* in the Baltic Sea Region. Associated Fungi, Their Pathogenicity and Implications for Silviculture: doctoral thesis. Uppsala, Swedish University of Agricultural Sciences: 48 str.
- Bakys R., Vasaitis R., Barklund P., Ihrmark K., Stenlid J. 2009a. Investigations concerning the role of *Chalara fraxinea* in declining *Fraxinus excelsior*. Plant Pathology, 58: 284–292
- Bakys R., Vasaitis R., Barklund P., Thomsen I., Stenlid J. 2009b. Occurrence and pathogenicity of fungi in necrotic and non-symptomatic shoots of declining common ash (*Fraxinus excelsior*) in Sweden. European Journal of Forest Research, 128: 51–60
- Bakys R., Vasaitis R. Skovsgaard J. P. 2013. Patterns and Severity of Crown Dieback in Young Even-Aged Stands of European Ash (*Fraxinus excelsior* L.) in Relation to Stand Density, Bud Flushing Phenotype, and Season. Plant Protection Science, 49: 120–126
- Bakys R., Vasiliauskas A., Ihrmark K., Stenlid J., Menkis A., Vasaitis R. 2011. Root rot, associated fungi and their impact on health condition of declining *Fraxinus excelsior* stands in Lithuania. Scandinavian Journal of Forest Research, 26: 128–135
- Baranchikov Y., Mozolevskaya E., Yurchenko G., Kenis M. Occurrence of the emerald ash borer, *Agrius planipennis* in Russia and its potential impact on European forestry. EPPO Bulletin, 38: 233–238
- Barić L., Županić M., Pernek M., Diminić D. 2012. Prvi nalaz patogene gljive *Chalara fraxinea* u Hrvatskoj - novog uzročnika odumiranja jasena (*Fraxinus spp.*). Šumarski list, 9–10: 461–469

- Bengtsson M., Green H., Leroul N., Pedersen H. L., Hockenhull J. 2006. Effect of autumn application of urea on saprotrophic fungi in off-season leaf litter of sour cherry and evaluation of fungal isolates to reduce primary inoculum of *Blumeriella jaapii*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 113: 107–112
- Bengtsson S. B. K. 2013. Dieback of *Fraxinue excelsior*. Biology of Ash Dieback and Genetic Variation of the Fungus *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. Doctoral thesis. Uppsala, Swedish University of Agricultural Sciences: 51 str.
- Bengtsson S. B. K., Vasaitis R., Kirisits T., Solheim H., Stenlid J. 2012. Population structure of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* and its genetic relationship to *Hymenoscyphus albidus*. *Fungal Ecology*, 5: 147–153
- Blenis P. V., Patton R. F., Spear R. N. 1984. Effect of temperature on the ability of *Gremmeniella abietina* to survive and to colonize host tissue. *European Journal of Forest Pathology*, 14: 153–164
- Burnham, K. P., Anderson, D. R. 2002. Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach. New York, Springer: 488 str.
- Cech T. L. 2006. Eschenschäden in Österreich - Ash Dieback and Premature Leaf Shedding in Austria. *Forstschutz Aktuell*, 37: 18–20
- Chandelier A., Delhaye N., Helson M. 2011. First Report of the Ash Dieback Pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus* (Anamorph *Chalara fraxinea*) on *Fraxinus excelsior* in Belgium. *Plant Disease*, 95: 220–220
- Cleary M. R., Arhipova N., Gaitnieks T., Stenlid J., Vasaitis R. 2013a. Natural infection of *Fraxinus excelsior* seeds by *Chalara fraxinea*. *Forest Pathology*, 43: 83–85
- Cleary M. R., Daniel G., Stenlid J. 2013b. Light and scanning electron microscopy studies of the early infection stages of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* on *Fraxinus excelsior*. *Plant Pathology*, 62, 6: 1294–1301
- Cook L., Fleming C., McCracken A. 2013. Efficacy of biocides, disinfectants and other treatments to limit the spread of ash dieback caused by *Chalara fraxinea*. AFBI: 37 str. http://www.afbini.gov.uk/efficacy_of_biocides_and_disinfectants_on_chalara_fraxinea_24_may_2013.pdf
- Dal Maso E., Fanchini G., Mutto Accordi S., Scattolin L., Montecchio L. 2012. Ultrastructural modifications in Common ash tissues colonised by *Chalara fraxinea*. *Phytopatologia Mediterranea*, 51, 3: 599–606
- Davydenko K., Vasaitis R., Stenlid J., Menkis A. 2013. Fungi in foliage and shoots of *Fraxinus excelsior* in eastern Ukraine: a first report on *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. *Forest Pathology*, 43, 6: 462–467
- Deacon J. W. 2006. Fungal Biology. Malden, Blackwell Publishing: 371 str.

- De Cal A., Larena I., Liñán M., Torres R., Lamarca N., Usall J., Domenichini P., Bellini A., De Eribe X. O. and Melgarejo, P. 2009. Population dynamics of *Epicoccum nigrum*, a biocontrol agent against brown rot in stone fruit. *Journal of Applied Microbiology*, 106: 592–605
- Delatour C., Morelet M. 1979. La pourriture noire des glands. *Revue Forestiere Française*, 31: 101–115
- Delatour C., Muller C., Bonnet-Masimbert M. 1982. Progress in acorns treatment in a long term storage prospect. V: Proceedings of the International Symposium on Forest Tree Seed Storage. Chalk River, Ontario, Canada. September, 23-27, 1980. Wang, B. S. P., Pitel, J. A. (ur.). Petawawa National Forestry Institute, Canadian Forestry Service: 126–133
- Drenkhan R., Hango M. 2010. New host species for *Chalara fraxinea*. *New Disease Reports*, 22: 16
- Eguchi N., Tokutake H., Yamagishi N. 2008. Hot water treatment of Japanese pear trees is effective against white root rot caused by *Rosellinia necatrix* Prillieux. *Journal of General Plant Pathology*, 74: 382–389
- Enderle R., Peters F., Nakou A., Metzler B. 2013. Temporal development of ash dieback symptoms and spatial distribution of collar roots in a provenience trial of *Fraxinus excelsior*. *European Journal of Forest Research*, 132, 5-6: 865–876
- Engesser R., Queloz V., Meier F., Kowalski T., Holdenrieder O. 2009. Das Triebsterben der Esche in der Schweiz. *Wald und Holz*, 6: 24–27
- Falconi C. J. Mendgen K. 1994. Epiphytic fungi on apple leaves and their value for control of the postharvest pathogens *Botrytis cinerea*, *Monilinia fructigena* and *Penicillium expansum*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 101, 1: 38–47
- First report of *Chalara fraxinea* in Ireland. 2013. EPPO Reporting Service, 1: 3–3
- First report of *Chalara fraxinea* in the Netherlands. 2010. EPPO Reporting Service, 9: 4–4
- First report of *Chalara fraxinea* in the United Kingdom. 2012. EPPO Reporting Service, 4: 7–8
- Grad B., Kowalski T., Kraj W. 2009. Studies on secondary metabolite produced by *Chalara fraxinea* and its phytotoxic influence on *Fraxinus excelsior*. *Phytopathologia*, 54: 61–69
- Grecs Z., Kolšek M., Jurc D., Ogris N. 2012. Jesenov ožig – *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, anamorf *Chalara fraxinea*. V: Navodila za preprečevanje in zatiranje škodljivcev in bolezni gozdnega drevja v Sloveniji: priročnik za javno gozdarsko službo. Jurc D., Kolšek M. (ur.). Ljubljana, Gozdarski inštitut Slovenije, Založba Silva Slovenica: 101–104
- Green H., Bengtsson M., Duval X., Lindhard Pedersen H., Hockenhull J., Larsen J. 2006. Influence of urea on the cherry leaf spot pathogen, *Blumeriella jaapii*, and on

- microorganisms in decomposing cherry leaves. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 2731–2742
- Gross A., Grünig C. R., Queloz V., Holdenrieder O. 2012a. A molecular toolkit for population genetic investigations of the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. *Forest Pathology*, 42: 252–264
- Gross A., Holdenrieder O. 2013. On the longevity of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* in petioles of *Fraxinus excelsior*. *Forest Pathology*, 43, 2: 168–170
- Gross A., Holdenrieder O., Pautasso M., Queloz V., Sieber T. N. 2014. *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the causal agent of European ash dieback. *Molecular Plant Pathology*, 15, 1: 5–21
- Gross A., Zaffarano P. L., Duo A., Grünig C. R. 2012b. Reproductive mode and life cycle of the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. *Fungal Genetics and Biology*, 49: 977–986
- Guillaumin J. J., Mohammed C., Anselmi N., Courtecuisse R., Gregory S. C., Holdenrieder O., Intini M., Lung B., Marxmüller H., Morrison D., Rishbeth J., Termorshuizen A. J., Tirró A. and van Dam B. 1993. Geographical distribution and ecology of the *Armillaria* species in western Europe. *European Journal of Forest Pathology*, 6–7, 23: 321–341
- Harman G. E. 2006. Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96: 190–194
- Hauptman T. 2011. Jesenov ožig po svetu in pri nas. V: Zbornik predavanj in referatov 10. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, Podčetrtek, 1.-2. marec 2011. Maček, J., Trdan, S. (ur.). Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije: 247–251
- Hauptman T., Jurc D. 2013. Ogroženost jesenov zaradi jesenovega ožiga v Sloveniji. V: Zbornik predavanj in referatov 11. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, Bled, 5.-6. marec 2013. Maček, J., Trdan, S. (ur.). Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije: 52–56
- Hauptman T., Ogris N., Jurc D. 2012a. Ash Dieback in Slovenia. V: Proceedings of the Third meeting of forest protection and forest phytosanitary experts. Vienna, 14.–16. oct. 2009. Vienna, Bundesamt und Forschungszentrum für Wald. (Forstschutz Aktuell, 55: 62–63)
- Hauptman T., Ogris N., Jurc D. 2010. Kaj se dogaja z jesenom pri nas? – Tretje nadaljevanje. *Gozdarski vestnik*, 68, 2: 71–73
- Hauptman T., Piškur B., De Groot M., Ogris N., Ferlan M., Jurc D. 2013. Temperature effect on *Chalara fraxinea*: heat treatment of saplings as a possible disease control method. *Forest pathology*, 43, 5: 360–370
- Hauptman T., Skudnik M., Jurc D. 2012b. Jesenov ožig v Sloveniji: poškodovanost jesenov v jesenovih semenskih objektih. V: Zbornik predavanj ob znanstvenem srečanju Gozd in

- les: izjemni znanstveni dosežki in učinki. Ljubljana, 21. maj 2012. Humar M. (ur.). Ljubljana, Zveza lesarjev Slovenije. (Les, 64, 5: 129–135)
- Hietala A. M., Timmermann V., Børja I., Solheim H. 2013. The invasive ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus* exerts maximal infection pressure prior to the onset of host leaf senescence. *Fungal Ecology*, 6: 302–308
- Holb I., Lakatos P., Abonyi F. 2010. Some aspects of disease management of cherry leafspot (*Blumeriella jaapii*) with special reference to pesticide use. *International Journal of Horticultural Science*, 16: 45–49
- Hopkin A. A., McKenney D. W. 1995. The distribution and significance of scleroderris disease in Ontario. Sault Ste. Marie, Ontario, Natural Resources Canada, Canadian Forest Service, Great Lakes Forestry Centre: 11 str.
- Husson C., Caël O., Grandjean J. P., Nageleisen L. M., Marçais B. 2012. Occurrence of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* on infected ash logs. *Plant Pathology*, 61: 889–895
- Husson C., Scala B., Caël O., Frey P., Feau N., Ioos N., Marçais B. 2011. *Chalara fraxinea* is an invasive pathogen in France. *European Journal of Plant Pathology*, 130: 311–324
- Ioos R., Kowalski T., Husson C., Holdenrieder O. 2009. Rapid in planta detection of *Chalara fraxinea* by a real-time PCR assay using a dual-labelled probe. *European Journal of Plant Pathology*, 125: 329–335
- Jankovsky L., Holdenrieder O. 2009. *Chalara fraxinea* - ash dieback in the Czech Republic. *Plant Protection Science*, 45: 74–78
- Johansson S. M., Pratt J. E., Asiegbu F. O. 2002. Treatment of Norway spruce and Scots pine stumps with urea against the root and butt rot fungus *Heterobasidion annosum*-possible modes of action. *Forest Ecology and Management*, 157: 87–100
- Junker C., Mandey F., Pais A., Ebel R., Schulz B. 2014. *Hymenoscyphus pseudoalbidus* and *Hymenoscyphus albidus*: viridiol concentration and virulence do not correlate. *Forest Pathology*, 44, 1: 39–44
- Jurc D. 2000. Obvladovanje najpomembnejših bolezni v gozdnih drevesnicah . Gozdarski vestnik, 58, 9: 370–376
- Jurc D. 2009. Kaj se dogaja z jesenom pri nas? - Prvo nadaljevanje. Gozdarski vestnik, 67, 2: 66–67
- Jurc D., Ogris N. 2008. Kaj se dogaja z jesenom pri nas? Gozdarski vestnik, 66, 4: 211–211
- Jurc M. 2008. Gozdna zoologija: univerzitetni učbenik. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire: 348 str.
- Kenigsvalde K., Arhipova N., Laivins M., Gaitnieks T. 2010. Fungus *Chalara fraxinea* as a causal agent for ash decline in Latvia. *Mežzinatne*, 21, 54: 110–120

- Keßler M., Cech T. L., Brandstetter M., Kirisits T. 2012. Dieback of Ash (*Fraxinus excelsior* and *Fraxinus angustifolia*) in Eastern Austria: Disease development on Monitoring plots from 2007 to 2010. *Journal of Agricultural Extension and Rural Development*, 4: 223–226
- Kirisits T., Cech T. L. 2009. Observations on the sexual stage of the ash dieback pathogen *Chalara fraxinea* in Austria. *Forstschutz Aktuell*, 48: 21–25
- Kirisits T., Dämpfle L., Kräutler K. 2013. *Hymenoscyphus albidus* is not associated with an anamorphic stage and displays slower growth than *Hymenoscyphus pseudoalbidus* on agar media. *Forest Pathology*, 43, 5: 386–389
- Kirisits T., Freinschlag C. 2012. Ash dieback caused by *Hymenoscyphus pseudoalbidus* in a seed plantation of *Fraxinus excelsior* in Austria. *Journal of Agricultural Extension and Rural Development*, 4: 184–191
- Kirisits T., Matlakova M., Mottinger-Kroupa S., Cech T. L., Halmschlager E. 2009. The current situation of ash dieback caused by *Chalara fraxinea* in Austria. *SDU Faculty of Forestry Journal*, Special Issue: 97–119
- Kirisits T., Matlakova M., Mottinger-Kroupa S., Halmschlager E. 2008. Involvement of *Chalara fraxinea* in ash dieback in Austria. *Forstschutz Aktuell*, 44: 16–18
- Kirisits T., Matlakova M., Mottinger-Kroupa S., Halmschlager E., Lakatos F. 2010. *Chalara fraxinea* associated with dieback of narrow-leaved ash (*Fraxinus angustifolia*). *Plant Pathology*, 59: 411–411
- Kjær E. D., McKinney L. V., Nielsen L. R., Hansen L. N., Hansen J. K. 2012. Adaptive potential of ash (*Fraxinus excelsior*) populations against the novel emerging pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. *Evolutionary Applications*, 5: 219–228
- Knudsen I. M. B., Thomsen K. A., Jensen B., Poulsen K. M. 2004. Effects of hot water treatment, biocontrol agents, disinfectants and a fungicide on storability of English oak acorns and control of the pathogen, *Ciboria batschiana*. *Forest Pathology*, 34: 47–64
- Koltay A., Szabò I., Janik G. 2012. *Chalara fraxinea* incidence in Hungarian ash (*Fraxinus excelsior*) forests. *Journal of Agricultural Extension and Rural Development*, 4: 236–238
- Kovač M. (ur.). 2013. Monitoring gozdov in gozdnih ekosistemov – priročnik za terensko snemanje podatkov. Ljubljana, Gozdarski inštitut Slovenije, v tisku
- Kowalski T. 2006. *Chalara fraxinea* sp nov associated with dieback of ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland. *Forest Pathology*, 36: 264–270
- Kowalski T., Bartnik C. 2010. Morphological variation in colonies of *Chalara fraxinea* isolated from ash (*Fraxinus excelsior* L.) stems with symptoms of dieback and effects of temperature on colony growth and structure. *Acta Agrobotanica*, 63: 99–106

- Kowalski T., Holdenrieder O. 2008. A new fungal disease of ash in Europe. Schweizerische Zeitschrift fur Forstwesen, 159: 45–50
- Kowalski T., Holdenrieder O. 2009a. Pathogenicity of *Chalara fraxinea*. Forest Pathology, 39: 1–7
- Kowalski T., Holdenrieder O. 2009b. The teleomorph of *Chalara fraxinea*, the causal agent of ash dieback. Forest Pathology, 39: 304–308
- Kowalski T., Łukomska A. 2005. Badania nad zamieraniem jesionu (*Fraxinus excelsior* L.) w drzewostanach Nadleśnictwa Włoszczowa. Acta Agrobotanica, 58: 429–440
- Kraj W., Zarek M., Kowalski T. 2011. Genetic variability of *Chalara fraxinea*, dieback cause of European ash (*Fraxinus excelsior* L.). Mycological Progress, 11: 1–9
- Kräutler K., Kirisits T. 2012. The ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus* is associated with leaf symptoms on ash species (*Fraxinus* spp.). Journal of Agricultural Extension and Rural Development, 4: 261–265
- Kunca A., Leontovyc R., Zubrik M., Gubka A. 2011. Bark beetle outbreak on weakened ash trees and applied control measures. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 41: 11–13
- Larena I., Torres R., De Cal A., Linán M., Melgarejo P., Domenichini P., Bellini A., Mandrin J. F., Lichou J., Ochoa de Eribe X., Usall J. 2005. Biological control of postharvest brown rot (*Monilinia* spp.) of peaches by field applications of *Epicoccum nigrum*. Biological control, 32, 2: 306–310
- Lenz H., Strasser L., Petercord R. 2012. Eschentriebsterben begünstigt Auftreten sekundärer Schadorganismen. Forstschutz Aktuell, 54: 26–28
- Lurie S. 1998. Postharvest heat treatments. Postharvest Biology and Technology, 14: 257–269
- Lygis V., Bakys R., Vasaitis R. 2009. Ash decline in Lithuania: the current situation and research. V: SNS Workshop, Network of Climate Change Risk on Forests. Tvärminne, Finland: 23 str.
- Lygis V., Vasiliauskas R., Larsson K. H., Stenlid J. 2005. Wood-inhabiting fungi in stems of *Fraxinus excelsior* in declining ash stands of northern Lithuania, with particular reference to *Armillaria cepistipes*. Scandinavian Journal of Forest Research, 20: 337–346
- McCullagh P., Nelder J. A. 1989. Generalized Linear Models. 2nd ed. Boca Raton (etc.), Chapman and Hall: 511 str.
- McKinney L.V., Nielsen L. R., Hansen J. K., Kjaer E. D. 2011. Presence of natural genetic resistance in *Fraxinus excelsior* (Oleraceae) to *Chalara fraxinea* (Ascomycota): an emerging infectious disease. Heredity, 106: 788–797
- McKinney L.V., Thomsen I. M., Kjær E. D., Bengtsson S. B. K., Nielsen L. R. 2012a. Rapid invasion by an aggressive pathogenic fungus (*Hymenoscyphus pseudoalbidus*) replaces a

- native decomposer (*Hymenoscyphus albidus*): a case of local cryptic extinction? *Fungal Ecology*, 5: 663–669
- McKinney L. V., Thomsen I. M., Kjær E. D., Nielsen L. R. 2012b. Genetic resistance to *Hymenoscyphus pseudoalbidus* limits fungal growth and symptom occurrence in *Fraxinus excelsior*. *Forest Pathology*, 42: 69–74
- Meng X., Mao Z., Lou J., Xu L., Peng Y., Zhou L., Wang M. 2012. Benzopyranones from the Endophytic Fungus *Hyalodendriella* sp. Ponipodef12 and Their Bioactivities. *Molecules*, 17, 10: 11303–11314
- Metzler B., Junker C., Lenz H., Enderle R., Schulz B. 2012. Ash dieback: situation and research in Germany. V: Abstracts of Country Presentations. 1st Fraxback meeting, Vilnius, 11.–16. november 2012. Vilnius, COST: 16–17
- Milevoj L., Gomboc S., Celar F., Simončič A., Gregorčič A., Valič N. 1999. Priročnik o fitofarmacevtskih sredstvih v Republiki Sloveniji. Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije: 550 str.
- Munda A. 1997. Raziskave štorovk (*Armillaria* (Fr.:Fr.) staude) v Sloveniji. V: Znanje za gozd: zbornik ob 50. obletnici obstoja in delovanja Gozdarskega inštituta Slovenije. Jurc M. (ur.). Ljubljana, Gozdarski inštitut Slovenije: 211–220
- Ogris N. 2008. Jesenov ožig, *Chalara fraxinea*. V: Novice iz varstva gozdov. Ljubljana, Gozdarski inštitut Slovenije, 1: 1–1
- Ogris N. 2009. Kaj se dogaja z jesenom pri nas? - Drugo nadaljevanje. *Gozdarski vestnik*, 67, 5/6: 251–252
- Ogris N., Hauptman T., Jurc D. 2009a. *Chalara fraxinea* causing common ash dieback newly reported in Slovenia. *Plant Pathology*, 58: 1173–1173
- Ogris N., Hauptman T., Jurc D., Floreancig V., Marsich F., Montecchio L. 2010. First Report of *Chalara fraxinea* on Common Ash in Italy. *Plant Disease*, 94: 133–133
- Ogris N., Jurc D., Trajber D. 2009b. Jesenov glivični rak v Črnem logu (*Neonectria galligena*). V: Novice iz varstva gozdov. Ljubljana, Gozdarski inštitut Slovenije, 2: 7–8
- Ogris N., Mlinšek G. 2010. Mraznica je poškodovala veliki jesen pri Radljah ob Dravi. V: Novice iz varstva gozdov: Ljubljana, Gozdarski inštitut Slovenije, 3: 2–3
- Orlikowski L. B., Ptaszek M., Rodziewicz A., Nechwatal J., Thinggaard K., Jung T. 2011. Phytophthora root and collar rot of mature *Fraxinus excelsior* in forest stands in Poland and Denmark. *Forest Pathology*, 41: 510–519
- Pautasso M., Aas G., Queloz V., Holdenrieder O. 2013. European ash (*Fraxinus excelsior*) dieback – A conservation biology challenge. *Biological Conservation*, 158: 37–49

- Pedersen H. L., Hansen P. 1997. Effect of timing of nitrogen supply on growth, bud, flower and fruit development of young sour cherries (*Prunus cerasus* L.). *Scientia Horticulturae*, 69: 181–188
- Percival G. C., Keary I. P., Al-Habsi S. 2006. An assessment of the drought tolerance of *Fraxinus* genotypes for urban landscape plantings. *Urban Forestry & Urban Greening*, 5: 17–27
- Pfister A. 2012. Aktuelle Schäden durch Eschenbastkäfer in der Steiermark. *Forstschutz Aktuell*, 54: 22–25
- Pham T. L. H., Zaspel I., Schuemann M., Stephanowitz H., Krause E. 2013. Rapid *In-Vitro* and *In-Vivo* Detection of *Chalara fraxinea* by Means of Mass Spectrometric Techniques. *American Journal of Plant Sciences*, 4: 444–453
- Piškur B. 2010. Kaj se dogaja z jesenom pri nas? - Četrto nadaljevanje. *Gozdarski vestnik*, 68, 5/6: 340–344
- Piškur B., Ogris N., Jurc D. 2007. Species-Specific Primers for *Eutypella parasitica*, the Causal Agent of Eutypella Canker of Maple. *Plant Disease*, 91: 1579–1584
- Pliura A., Lygis V., Gustiene A., Marciulyniene D., Suchockas V. 2012. Situation with ash in Lithuania: stand characteristics, health conditions, ongoing work and research needs. V: Abstracts of Country Presentations. 1st Fraxback meeting, Vilnius, 11.–16. november 2012. Vilnius, COST: 21–23
- Pliura A., Lygis V., Suchockas V., Bartkevicius E. 2011. Performance of Twenty Four European *Fraxinus excelsior* Populations in Three Lithuanian Progeny Trials with a Special Emphasis on Resistance to *Chalara Fraxinea*. *Baltic Forestry*, 17: 17–34
- Przybyl K 2002. Fungi associated with necrotic apical parts of *Fraxinus excelsior* shoots. *Forest Pathology*, 32: 387–394
- Pukacki P. M., Przybył K. 2005. Frost Injury as a Possible Inciting Factor in Bud and Shoot Necroses of *Fraxinus excelsior* L. *Journal of Phytopathology*, 153: 512–516
- Queloz V., Grunig C. R., Berndt R., Kowalski T., Sieber T. N., Holdenrieder O. 2011. Cryptic speciation in *Hymenoscyphus albidus*. *Forest Pathology*, 41: 133–142
- Quinn G., Keough M. 2002. Experimental design and data analysis for biologists. Cambridge, Cambridge University Press: 556 str.
- R Development Core Team. 2011. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria, R Foundation for Statistical Computing
- Regliński T., Rodenburg N., Taylor J. T., Northcott G. L., Ah Chee A., Spiers T. M., Hill R. A. 2012. *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic resistance to *Diplodia pinea* in radiata pine (*Pinus radiata*) seedlings. *Forest Pathology*, 42: 75–78

- Rooney S. N., Gubler W. D. 2001. Effect of hot water treatments on eradication of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium inflatipes* from dormant grapevine wood [*Vitis vinifera* L.]. *Phytopathologia Mediterranea*, 40: 467–472
- Rytkonen A., Lilja A., Drenkhan R., Gaitnieks T., Hantula J. 2011. First record of *Chalara fraxinea* in Finland and genetic variation among isolates sampled from Åland, mainland Finland, Estonia and Latvia. *Forest Pathology*, 41: 169–174
- Saitou N., Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406–425
- Santamaría O., González M. A., Pajares J. A., Diez J. J 2007. Effect of fungicides, endophytes and fungal filtrates on in vitro growth of Spanish isolates of *Gremmeniella abietina*. *Forest Pathology*, 37: 251–262
- Santini A., Ghelardini L., De Pace C., Desprez-Loustau M. L., Capretti P., Chandelier A., Cech T., Chira D., Diamantis S., Gaitniekis T., Hantula J., Holdenrieder O., Jankovsky L., Jung T., Jurc D., Kirisits T., Kunca A., Lygis V., Malecka M., Marcais B., Schmitz S., Schumacher J., Solheim H., Solla A., Szabo I., Tsopelas P., Vannini A., Vettraino A. M., Webber J., Woodward S., Stenlid J. 2013. Biogeographical patterns and determinants of invasion by forest pathogens in Europe. *New Phytologist*, 197: 238–250
- Scherrer D., Bader M. K. F., Körner C. 2011. Drought-sensitivity ranking of deciduous tree species based on thermal imaging of forest canopies. *Agricultural and Forest Meteorology* 151: 1632–1640
- Schroder T. 2002. On the geographic variation of *Ciboria batschiana* (Zopf) Buchwald, the main pathogenic fungus on acorns of *Quercus robur* and *Q. petraea* in Europe. *Dendrobiology*, 47: 13–19
- Schumacher J., Kehr R., Leonhard S. 2010. Mycological and histological investigations of *Fraxinus excelsior* nursery saplings naturally infected by *Chalara fraxinea*. *Forest Pathology*, 40: 419–429
- Schumacher J., Wulf A., Leonhard S. 2007. First record of *Chalara fraxinea* T. Kowalski sp. nov. in Germany - a new agent of ash decline. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes*, 59: 121–123
- Seznam registriranih fitofarmacevtskih sredstev na dan 16. 9. 2013.
<http://spletne2.furs.gov.si/FFS/REGSR/index.htm> (16. 9. 2013)
- Siegel S., Castellan N. J. 1988. Non parametric statistics for the behavioural sciences. New York, MacGraw-Hill Publishing co.: 330 str.
- Skilling D., Schneider B., Podolski T. 1984. Testing Fungicides for Control of *Gremmeniella abietina* in New York. V: *Scleroterris* canker of conifers. Manion P. (ur.). Springer: 212–216

- Skovsgaard J.P., Thomsen I. M., Skovgaard I. M., Martinussen T. 2010. Associations among symptoms of dieback in even-aged stands of ash (*Fraxinus excelsior* L.). Forest Pathology, 40: 7–18
- Solheim H., Timmermann V., Børja I., Hietala A.M. 2011. A small ascomycete, *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, is a threat to common ash in Europe. Agarica, 30: 82–88
- Stener L. G. 2013. Clonal differences in susceptibility to the dieback of *Fraxinus excelsior* in southern Sweden. Scandinavian Journal of Forest Research, 28, 3: 205–216
- Sutton D. K., MacHardy W. E., Lord W. G. 2000. Effects of Shredding or Treating Apple Leaf Litter with Urea on Ascospore Dose of *Venturia inaequalis* and Disease Buildup. Plant Disease, 84: 1319–1326
- Szabo I. 2009. First report of *Chalara fraxinea* affecting common ash in Hungary. Plant Pathology, 58: 797–797
- Talgo V., Sletten A., Brurberg M. B., Solheim H., Stensvand A. 2009. *Chalara fraxinea* Isolated from Diseased Ash in Norway. Plant Disease, 93: 548–548
- Tamura K., Nei M., Kumar S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proceedings of the National Academy of Sciences, 101: 11030–11035
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution, 28: 2731–2739
- Thomsen I. M., Skovgaard J. P., Barklund P., Vasaitis R. 2007. Svampesygdom er årsag til toptørre i ask = A fungal disease is the cause of ash dieback. Skoven, 5: 234–236
- Timber: podatkovna zbirka o poseku gozdnega drevja 2000–2012. Ljubljana, Zavod za gozdove Slovenije
- Timmermann V., Børja I., Hietala A. M., Kirisits T., Solheim H. 2011. Ash dieback: pathogen spread and diurnal patterns of ascospore dispersal, with special emphasis on Norway. EPPO Bulletin, 41: 14–20
- Tomlin C. D. S. 2003. The pesticide manual: a world compendium. Alton, British Crop Protection Council: 1344 str.
- Trinci A. P. J. A. 1969. Kinetic Study of the Growth of *Aspergillus nidulans* and Other Fungi. Journal of General Microbiology, 57: 11–24
- Udayanga D., Xingzhong L., McKenzie E. H. C., Chukeatirote E., Bahkali A. H. A., Hyde K. D. 2011. The genus Phomopsis: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. Fungal Diversity, 50, 1: 189–225

- Veverka K., Štolcová J., Růžek P. 2007. Sensitivity of Fungi to Urea, Ammonium Nitrate and their Equimolar Solution UAN. *Plant Protection Science*, 43: 157–164
- Waite H., May P. 2005. The Effects of Hot Water Treatment, Hydration and Order of Nursery Operations on Cuttings of *Vitis vinifera* Cultivars. *Phytopathologia Mediterranea*, 44: 144–152
- Waite H., Morton L. 2007. Hot water treatment, trunk diseases and other critical factors in the production of high-quality grapevine planting material. *Phytopathologia Mediterranea*, 46: 5–17
- Westergren M., Božič G., Köveš I., Kraigher H. 2013. Identifikacija klonov poljskega jesena (*Fraxinus angustifolia* Vahl.) na semenski plantaži Hraščica (Slovenia) z genetskimi metodami = Identification of narrow-leaved ash (*Fraxinus angustifolia* Vahl.) clones in theseed orchard Hraščica (Slovenia) using molecular genetics methods. *Les*, 65, 1/2: 21–29
- Witting H. P. P., Johnson K. B., Pscheidt J. W. 1997. Effect of Epiphytic Fungi on Brown Rot Blossom Blight and Latent Infections in Sweet Cherry. *Plant Disease*, 81, 4: 383–387
- Zhao Y. J., Hosoya T., Baral H. O., Hosaka K., Kakishima M. 2012. *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the correct name for *Lambertella albida* reported from Japan. *Mycotaxon*, 122: 25–41
- Zheng H. D., Zhuang W. Y. 2014. *Hymenoscyphus alboides* sp. nov. and *H. pseudoalbidus* from China. *Mycological Progress*, v tisku
- Zhong L., Xu L., Meng X., Peng Y., Chen Y., Sui P., Wang M., Zhou L. 2011. Botrallin from the endophytic fungus *Hyalodendriella* sp. Ponipodef12 and its antimicrobial activity. *African Journal of Biotechnology*, 79, 10: 18174–18178
- Zhou T., Reeler R. D. 1990. Selection of strains *Epicoccum purpurascens* for tolerance to fungicides and improved biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 36, 11: 754–759
- Zuur A., Ieno E. N., Walker N., Savelie A. A., Smith G. M. 2009. Mixed effect models and extensions in ecology with R. New York, Springer: 574 str.

ZAHVALA

Na prvem mestu se iskreno zahvaljujem prof. dr. Dušanu Jurcu, šefu in mentorju, ki si ga vsak raziskovalec lahko le želi! Hvala za vse nasvete, ideje, znanje, razumevanje in potrpežljivost.

Za vso pomoč pri svojem delu in za izjemno delovno vzdušje na Oddelku za varstvo gozdov Gozdarskega inštituta Slovenije se zahvaljujem sodelavcem dr. Barbari Piškur, Zini Devetak, dr. Nikici Ogrisu in dr. Maartenu de Grootu.

Pri izvedbi raziskav so pomagali tudi številni drugi sodelavci z Gozdarskega inštituta Slovenije, predvsem pa bi se zahvalil dr. Mitji Ferlanu, Mitji Skudniku, Juretu Žlogarju in Zvonetu Kastelicu.

Posebna zahvala gre tudi prof. dr. Franciju Celarju z Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete v Ljubljani, ki mi je s koristnimi nasveti pomagal pri raziskavah možnosti kemičnega zatiranja patogena.

Ves čas raziskav smo uspešno sodelovali z Zavodom za gozdove Slovenije. Tako ali drugače so pomagali številni zaposleni, različne »akcije« pa je vedno vodila Marija Kolšek.

Za podporo pri raziskovalnem delu se zahvaljujem tudi vodjem Gozdarskega inštituta Slovenije, nekdanjima direktorjema prof. dr. dr. h. c. Niku Torelliju in dr. Mirku Medvedu ter sedanjemu direktorju dr. Primožu Simončiču.

Delo je bilo opravljeno v okviru projekta Jesenov ožig v Sloveniji in proučevanje gline *Chalara fraxinea* (L4-2301), ki sta ga financirala Javna agencija za raziskovalno dejavnost RS (ARRS) in Ministrstvo za kmetijstvo in okolje (MKO). Obiski nekaterih znanstvenih srečanj na temo jesenovega ožiga so bili financirani v okviru COST akcije FRAXBACK. Podiplomski študij je bil sofinanciran v okviru Inovativne sheme za sofinanciranje doktorskega študija za spodbujanje sodelovanja z gospodarstvom in reševanja aktualnih družbenih izzivov. Finančna sredstva za to sta zagotovila Ministrstvo za izobraževanje, znanost in šport in Evropski socialni sklad.

Za hiter pregled disertacije se zahvaljujem obema recenzentoma, prof. dr. Francu Batiču in prof. dr. Danku Diminiću.

Za pregled angleških delov besedila se zahvaljujem prijatelju Domnu Kavčiču.

Na koncu se zahvaljujem svojim najbližnjim, staršem, sestri, bratu in predvsem mojima puncama, Katarini in Neži. Hvala, ker ste me podpirali, spodbujali in stali ob strani.

PRILOGA A

Shema semenske plantaže poljskega jesena (*F. angustifolia*) v Hraščici. Z barvo so označena drevesa treh klonov, ki so bili v raziskavi nekoliko natančneje pregledani (opravili smo tudi pregled poškodovanosti korenčnikov). Z zvezdico so označena drevesa, katerih vejice so bile inokulirane z glivo *C. fraxinea*. Razdalja med posameznimi stolpcji je 5 m, med vrstami pa 6 m.

