

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Andreja REPE

**GLIVNE ASOCIACIJE SMREKOVIH
PODLUBNIKOV (CURCULIONIDAE: SCOLYTINAE)
S POUDARKOM NA OFIOSTOMATOIDNIH
GLIVAH V SLOVENIJI**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Andreja REPE

**GLIVNE ASOCIACIJE SMREKOVIH PODLUBNIKOV
(CURCULIONIDAE: SCOLYTINAE) S POUDARKOM NA
OPIOSTOMATOIDNIH GLIVAH V SLOVENIJI**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**FUNGAL ASSOCIATES OF SPRUCE BARK BEETLES
(CURCULIONIDAE: SCOLYTINAE) WITH AN EMPHASIS ON
OPHIOSTOMATOID FUNGI**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2014

Doktorska disertacija je zaključek doktorskega študija bioloških in biotehniških znanosti s področja gozdarstva in obnovljivih virov na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Raziskave so bile opravljene v Skupini za varstvo gozdov in ekologijo prostozivečih živali Oddelka za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Terenski del naloge je bil izveden na območjih: Bled, Kočevje, Ljubljana, Litija in Dravograd. Laboratorijsko delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za varstvo gozdov, na Oddelku za varstvo gozdov Gozdarskega inštituta Slovenije ter v Laboratoriju za aplikativno botaniko, genetiko in ekologijo na Oddelku za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete (5-1530/09 VJJ) in sklepa Senata Univerze z dne 28. 9. 2009 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za neposreden prehod na doktorski podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje doktorata znanosti s področja gozdarstva in obnovljivih virov. Z odločbo dekana Biotehniške fakultete (5-681/11/11 VJJ) je bila 4. 11. 2012 sprejeta tema in naslov disertacije. Za mentorico je bil imenovana prof. dr. Maja Jurc.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Miha Humar, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo

Članica: znan. sod. dr. Barbara Piškur, Gozdarski inštitut Slovenije, Oddelek za varstvo gozdov

Član: prof. dr. Boris Hrašovec, Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Andreja REPE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd
DK GDK 443+453:174.7(497.4)(043.3)=163.6
KG *Picea abies*/ofiostomatoidne glive/podlubniki/inokulacije/varstvo gozdov
KK
AV REPE, Andreja, univ. dipl. inž. gozd.
SA JURC, Maja (mentorica)
KZ SI-1000, Večna pot 83
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje gozdarstvo in obnovljivi gozdni viri
LI 2014
IN GLIVNE ASOCIACIJE SMREKOVIH PODLUBNIKOV (CURCULIONIDAE: SCOLYTINAE) S POUDARKOM NA OFIOSTOMATOIDNIH GLIVAH V SLOVENIJI
TD Doktorska disertacija
OP X, 122 str., 31 sl., 24 preg., 148 vir.
IJ sl
JI sl/en

AI Ofiostomatoidne glive najpogosteje uvrščamo v družino Ophiostomataceae, deblo Ascomycota, in jih najpogosteje izoliramo iz podlubnikov ali njihovih rovnih sistemov v lesnatih rastlinah. Nekatere med njimi lahko skupaj s podlubniki povzročajo močnejše odmiranje navadne smreke (*Picea abies*). Cilj naloge je bil preučiti glivno združbo v povezavi s tremi smrekovimi podlubniki (*Ips typographus*, *Ips amitinus* in *Pityogenes chalcographus*) ter z inokulacijami v gostiteljsko drevo ugotoviti patogenost ofiostomatoidnih gliv in oceniti njihovo zmožnost povzročiti odmiranje gostiteljskih dreves. Podlubnike smo vzorčili v štirih fitogeografskih regijah Slovenije v letih 2008–2010. Njihove asociacijske glive smo določili morfološko, določitve smo potrdili s primerjavami zaporedij DNA in nato opravili filogenetsko analizo najdenih taksonov. Odkrili smo 13 različnih taksonov. Najpogosteje smo našli vrste: *Ophiostoma bicolor*, *Ophiostoma brunneo-ciliatum*, *Grosmannia piceiperda*, *Ophiostoma ainoae*, *Ceratocystiopsis minuta* in *Grosmannia penicillata*. Vrstna sestava gliv se je med podlubniki razlikovala, ni pa se razlikovala v različnih fitogeografskih regijah. Leta 2010 smo med majem in oktobrom izvedli umetne inokulacije navadne smreke, in sicer odraslih dreves (na raziskovalni ploskvi Litija) in sadik (v zaprtih, nadzorovanih pogojih). Spremljali smo različne dejavnike: tok smole, velikosti nekroz ter obarvanost in osušenost beljave. Vrsta *Ceratocystis polonica* je povzročila obarvanje beljave, velike nekroze ter odmrte nekaj odraslih dreves in sadik. Ugotovili smo fitopatogenost gliv *C. polonica*, *Leptographium* sp.-1 in *O. ainoae*, ki so povzročile obarvanje beljave sadik. V posamičnih inokulacijah je vrsta *G. piceiperda* povzročila velike nekroze in je imela višje vrednosti za vse raziskovane značilnosti. Ofiostomatoidne glive stimulirajo obrambne mehanizme gostiteljskih dreves. Posledično se drevesa izčrpavajo in slabijo, zato lahko vektorji ofiostomatoidnih gliv, podlubniki, lažje kolonizirajo drevesa.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC GDK 443+453:174.7(497.4)(043.3)=163.6
CX *Picea abies*/ophiostomatoid fungi/bark beetles/inoculations/forest protection
CC
AU REPE, Andreja
AA JURC, Maja (supervisor)
PP SI-1000, Večna pot 83
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Sciences, field Forestry and Renewable Forest Resources
PY 2014
TI FUNGAL ASSOCIATES OF SPRUCE BARK BEETLES (CURCULIONIDAE: SCOLYTINAE) WITH AN EMPHASIS ON OPHIOSTOMATOID FUNGI
DT Doctoral Dissertation
NO X, 122 p., 31 fig., 24 tab., 148 ref.
LA sl
AL sl/en

AB Ophiostomatoid fungi are group represented by several genera, family Ophiostomataceae, Ascomycota, and are most frequently isolated from bark beetles or their galleries in woody plants. Some of them can together with bark beetles affect the health and economic value of Norway spruce trees (*Picea abies*). Aim of this dissertation was to study the assemblages of ophiostomatoid fungi associated with three bark beetle species (*Ips typographus*, *Ips amatinus*, and *Pityogenes chalcographus*) that infect *P. abies* in Slovenia and to establish the pathogenicity of ophiostomatoid fungi in inoculations and to assess the ability of ophiostomatoid fungi to cause death of host trees. Bark beetles were sampled in four phytogeographic regions in Slovenia between 2008 and 2010. The fungi found on the bark beetles were identified based on morphology, DNA sequence comparisons of ITS regions and phylogenetic analysis. 13 different species were found. The most commonly found were *Ophiostoma bicolor*, *Ophiostoma brunneo-ciliatum*, *Grosmannia piceiperda*, *Ophiostoma ainoae*, *Ceratocystiopsis minuta*, and *Grosmannia penicillata*. The composition of the fungal associates differed among the bark beetle species, but not among the phytogeographic regions. Between May and October in 2010 artificial inoculation of mature (Litija research plot) and seedling (indoors, under controlled conditions) Norway spruce trees with various ophiostomatoid fungi were performed. Following factors were monitored: the resin outflow, the size of necrosis, discoloration and desiccation of sapwood. *C. polonica* caused blue stain, induced large lesions and killed some of the mature trees and seedlings. Only *C. polonica*, *Leptographium* sp.-1 and *O. ainoae* caused blue stain in the sapwood of inoculated seedlings. In low density inoculations, *G. piceiperda* induced intense necrosis and had higher values for all the features monitored. Fungi with the capacity to stimulate host's defence mechanisms can consequently cause their premature death could play a role in bark beetles population establishment.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMNETACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE	X

1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 GLIVE	4
2.1.1 Taksonomija	4
2.1.2 Morfološke značilnosti ofiostomatoidnih gliv	6
2.1.3 Določanje gliv z molekularnimi tehnikami	7
2.1.4 Bolezni gostiteljskih dreves, ki jih povzročajo ofiostomatoidne glive	12
2.1.4.1 Patogeni obarvanja beljave	15
2.1.4.2 Sistemski vaskularni patogeni uvelosti – traheomikoze	15
2.1.4.3 Nesistemski vaskularni patogeni modrenja	16
2.1.4.4 Testi patogenosti ofiostomatoidnih gliv	17
2.1.5 Vpliv spremembe okolja na ofiostomatoidne glive	18
2.1.6 Pregled ofiostomatoidnih gliv v Sloveniji	18
2.2 PODLUBNIKI	19
2.2.1 Prenos z vektorji	19
2.3 OBJAVE RAZISKAV TE DOKTORSKE DISERTACIJE	22
3 MATERIAL IN METODE	23
3.1 RAZISKOVALNE PLOSKVE, VZORČENJE IN PRIPRAVA VZORCEV	23
3.2 IZOLACIJA IN MORFOLOŠKA DOLOČITEV GLIV	26
3.2.1 Izolacija gliv	26
3.2.2 Morfologija	28
3.3 MOLEKULARNE METODE	29
3.3.1 Izolacija genomske DNA	29
3.3.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	31
3.3.3 Agarozna elektroforeza	32
3.3.4 Čiščenje produktov PCR	33
3.3.5 Določanje nukleotidnega zaporedja	34
3.3.6 Analiza nukleotidnega zaporedja	34
3.3.7 Filogenetska analiza	35
3.4 PATOGENOST GLIV MODRIVK	36
3.4.1 Množična inokulacija dreves navadne smreke	38
3.4.2 Posamična inokulacija dreves navadne smreke	40
3.4.3 Inokulacija sadik navadne smreke	41
3.5 ANALIZA PODATKOV	42
4 REZULTATI	44
4.1 IZOLACIJA IN DOLOČANJE GLIV	44

4.1.1 Opis gliv	45
4.2 FILOGENETSKA ANALIZA	65
4.3 GLIVE V ASOCIACIJI Z RAZLIČNIMI PODLUBNIKI	68
4.4 GLIVE V ASOCIACIJI Z RAZLIČNIMI ŽIVLJENJSKIMI STADIJI PODLUBNIKA IN ROVNIMI SISTEMI RAZISKOVANIH PODLUBNIKOV V LESU	70
4.5 GLIVE V RAZLIČNIH FITOGEOGRAFSKIH REGIJAH	72
4.6 ASOCIACIJE MED GLIVNIMI PARI.....	73
4.7 TESTI PATOGENOSTI.....	74
4.7.1 Množična inokulacija	74
4.7.2 Posamične inokulacije	77
4.7.3 Inokulacija sadik navadne smreke v kontroliranih razmerah	79
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	81
5.1 RAZPRAVA.....	81
5.1.1 Izolacija ofiostomatoidnih gliv	81
5.1.2 Filogenetska analiza	83
5.1.3 Ofiostomatoidne glive in smrekovi podlubniki	84
5.1.4 Glive v asociaciji z različnimi življenjskimi stadiji podlubnika in rovnimi sistemi v lesu	87
5.1.5 Asociacije med glivnimi pari.....	87
5.1.6 Patogenost ofiostomatoidnih gliv	88
5.1.6.1 Množične inokulacije odraslih dreves in inokulacije sadik.....	88
5.1.6.2 Inokulacije nizke gostote in inokulacije sadik.....	90
5.2 SKLEPI.....	91
5.2.1 Zastavljene raziskovalne hipoteze z odgovori.....	91
5.2.2 Kako v prihodnje prepoznati negativne vplive obravnavane skupine gliv na sestoje in kako jih preprečiti?	95
6 POVZETEK (SUMMARY).....	97
6.1 POVZETEK	97
6.2 SUMMARY	101
7 VIRI	107
ZAHVALA	121

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Značilnosti raziskovalnih lokacij, seznam vzorcev in podlubnikov	24
Preglednica 2: Oligonukleotidni začetniki uporabljeni v molekularnih analizah raziskave	31
Preglednica 3: Med raziskavo pridobljene glive, ki smo jih uporabili za preučevanje patogenosti.....	37
Preglednica 4: Značilnosti raziskovalne lokacije Litija.....	37
Preglednica 5: Reprezentativni vzorci gliv izoliranih med raziskavo	46
Preglednica 6: Meritve morfoloških značilnosti za vrsto <i>Ceratocystis polonica</i>	47
Preglednica 7: Meritve morfoloških značilnosti <i>Ceratocystiopsis cf. minuta</i>	49
Preglednica 8: Meritve morfoloških značilnosti <i>Graphium fimbriisporum</i>	50
Preglednica 9: Meritve morfoloških značilnosti <i>Grosmannia cucullata</i>	51
Preglednica 10: Meritve morfoloških značilnosti <i>Grosmannia penicillata</i>	53
Preglednica 11: Meritve morfoloških značilnosti <i>Grosmannia piceiperda</i>	55
Preglednica 12: Meritve morfoloških značilnosti za <i>Leptographium</i> sp.-1.....	56
Preglednica 13: Meritve morfoloških značilnosti za <i>Ophiostoma ainoae</i>	58
Preglednica 14: Meritve morfoloških značilnosti za <i>Ophiostoma bicolor</i>	59
Preglednica 15: Meritve morfoloških značilnosti za <i>Ophiostoma brunneo-ciliatum</i>	60
Preglednica 16: Meritve morfoloških značilnosti za <i>Ophiostoma fuscum</i>	61
Preglednica 17: Meritve morfoloških značilnosti za <i>Ophiostoma piceae</i>	64
Preglednica 18: Meritve morfoloških značilnosti za <i>Pesotum</i> sp.-1	64
Preglednica 19: Ofiostomatoidne glive, ki smo jih med raziskavo izolirali iz podlubnikov <i>I. typographus</i> , <i>P. chalcographus</i> in <i>I. amitinus</i>	69
Preglednica 20: Vrste gliv v asociaciji z <i>I. amitinus</i> glede na substrat izolacije.....	70
Preglednica 21: Ofiostomatoidne glive izolirane v različnih fitogeografskih regijah Slovenije	73
Preglednica 23: Rezultati posamične inokulacije, Litija, 15. 9. 2010	78
Preglednica 24: Rezultati inokulacije sadik, inokulirane glivne vrste, oznake inokuliranih sadik, velikosti nekroz ob inokulacijskih točkah in posušena drevesa.....	80

KAZALO SLIK

Slika 1: Položaj treh kodirajočih 18S, 5,8S, 28S in dveh medgenskih regij notranjega prepisnega vmesnika ITS1 in ITS2 ter mesta naleganja oligonukleotidnih začetnikov ITS1-F, ITS1 in ITS4	10
Slika 2: Zemljevid fitogeografskih območij in raziskovalnih lokacij (1 = Boršt, 2 = Ig, 3 = Pugled, 4 = Vučja jama, 5 = Košenjak)	23
Slika 3: Izolacija gliv iz lesa: a) leseni kolut, b) krožni izsek, c) sterilni odvzem lesa izpod vhodne odprtine na tnatlu narejenem za to raziskavo, d) vzorec za izolacijo gliv	25
Slika 4: Vzorci lesa položeni na gojišče MEA	26
Slika 5: Gojišče MEA, obogateno z lesom za dodatno spodbudo sporulacije	28
Slika 6: Fragmenti DNA, ločeni z agarozno gelsko elektroforezo (obarvani z barvilom SYBR® Safe) za preverjanje kakovosti produkta PCR	33
Slika 7: Primer izpisa avtomatskega sekvencerja; pogled na Chromas Lite 2.01. Zaporedje sestavlja serija vrhov, ki predstavljajo nukleotide: adenin (zelen), citozin (moder), gvanin (črn) in timin (rdeč)	35
Slika 8: Množična inokulacija odraslih dreves: a) šablona, b) z luknjačem smo odstranili skorjo	39
Slika 9: Inokulacijske točke na deblu navadne smreke z odstranjeno skorjo: a) sredina inokuliranega pasu, b) inokulacije na zgornjem delu inokuliranega pasu	40
Slika 10: Kontrolni inokulum brez glive	40
Slika 11: Inokulacije sadik navadne smreke: a) sadike pred prevzemom v drevesnici, b) ranica za inokulacijo z glivo, c) inokulirana sadika	41
Slika 12: <i>Ceratocystis polonica</i> : a) peritecij v kulturi, b) peritecij, c) ostiol peritecija s hifami, d) askospore	48
Slika 13: <i>Ceratocystiopsis cf. minuta</i> : a) preprost konidiofor s konidiji, b) periteciji v kulturi, c) peritecij z askosporami, d) vrh peritecija s hifami ostiola	49
Slika 14: <i>Graphium fimbriisporum</i> : a) konidiofor – koremij, b) konidiji	51
Slika 15: <i>Grosmannia cucullata</i> : a) periteciji in vrh peritecija z ostiolarnimi hifami, b) askospore, c) koremij, d) konidiji	52
Slika 16: <i>Grosmannia penicillata</i> : a) anamorf <i>Leptographium</i> , b) konidiji, c) peritecij, d) askospore	54
Slika 17: <i>Grosmannia piceiperda</i> : a) anamorf – <i>Leptographium</i> s konidiji, b) periteciji v kulturi, c) periteciji, d) askospore	55
Slika 18: <i>Leptographium</i> sp.-1: a) <i>Leptographium</i> oblika anamorfa, b) vrh konidiofora, c) konidiji	57
Slika 19: <i>Ophiostoma ainoae</i> : a) koremiji v kulturi, b) <i>Hyalorhinocladiella</i> anamorf, c) <i>Pesotum</i> anamorf, d) konidiji	58
Slika 20: <i>Ophiostoma bicolor</i> : a) periteciji v kulturi, b) peritecij, c) askospore	59
Slika 21: <i>Ophiostoma brunneo-ciliatum</i> : a) peritecij, b) ostiol peritecija s hifami	61
Slika 22: <i>Ophiostoma fuscum</i> : a) <i>Pesotum</i> oblika v kulturi, b) <i>Pesotum</i> anamorf – koremiji, c) konidiji	62
Slika 23: <i>Ophiostoma piceae</i> : a) nespolna oblika (koremiji) v kulturi, b) konidiji	64
Slika 24: <i>Pesotum</i> sp.-1: a) in b) <i>Pesotum</i> stadij v kulturi, c) <i>Sporothrix</i> , d) konidiji	65
Slika 26: Ofiostomatoidne glive v rovih podlubnikov	71

Slika 27: Pojavljanje gliv na različnih globinah v lesu glede na višino debla. Os X ponazarja višine debla od tal (metri), kjer smo vzeli vzorce lesa, os Y pa številčno pojavljanje gliv. Vsak stolpec pove, koliko je bilo gliv v lesu na 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30 in 35 milimetrih.	72
Slika 28: Rezultat množične inokulacije: a) posušeno drevo, slikano na lokaciji Litija (september, 2010), b)obarvanje beljave (oktober 2010)	76
Slika 29: Grafična predstavitev PCA na 12 drevesih navadne smreke; definirana je z dvema osema, ki predstavlja 82,8 % (os 1 = 61,3 %, os 2 = 21,5 %) celotne informacije. 1 = <i>C. polonica</i> ZLVG348, 2 = <i>C. polonica</i> ZLVG349, 3 = kontrola.	76
Slika 30: Nekroza, ki jo je povzročila gliva <i>G. piceiperda</i> ob posamični inokulaciji navadne smreke (15. 9. 2010)	77
Slika 31: Grafična predstavitev analize PCA za 38 inokulacij na drevesih navadne smreke na ravnini za prvi dve osi , ki predstavlja 87,7 % (os 1 = 74,3 %, os 2 = 15,2 %) celotne informacije. 1 = kontrola, 2 = <i>O. fuscum</i> , 3 = <i>O. ainoae</i> , 4 = <i>G. piceiperda</i> , 5 = <i>O. brunneo-ciliatum</i> , 6 = <i>Leptographium</i> sp.-1, 7 = <i>G. penicillata</i> , 8 = <i>O. bicolor</i> , 9 = <i>G. cucullata</i> in 10 = <i>O. piceae</i>	79

OKRAJŠAVE

BLAST	orodje za lokalno poravnavanje zaporedij, angl. Basic Local Alignment Search Tool
bp	bazni par
CTAB	cetil trimetil amonijev bromid
diH ₂ O	deionizirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksiribonukleotidi
EDTA	etilendiamin tetraocetna kislina – dinatrijeva sol
ITS	notranji prepisni vmesnik ribosomske DNA, angl. internal transcribed spacer
M	molarnost ali molarna koncentracija (mol/l)
MEA	agar s sladnim ekstarktom
MEGA	integrirano orodje za izvajanje samodejne in ročne poravnave zaporedij, urejanje zaporedij, gradnjo filogenetskih dreves, angl. Molecular Evolutionary Genetics Analysis
NJ	metoda združevanja sosedov, angl. Neighbor -Joining Method
PCR	verižna reakcija s polimerazo, angl. Polymerase Chain Reaction
rDNA	ribosomalna DNA
RNA	ribonukleinska kislina
sdH ₂ O	sterilna destilirana voda
TBE	tris-Borat-EDTA elektroforetski pufer
Tris	tris (hidroksimetil) aminometan

1 UVOD

Med podlubniki (Curculionidae: Scolytinae) je mnogo vrst, ki z namnožitvami povzročijo ekonomsko škodo v gozdu. Za uspešno preprečevanje poškodb in upravljanje sestoji v smislu ohranjanja vitalnih in stabilnih gozdov moramo poznavati vrstno sestavo in biologijo podlubnikov. Poznavanje biologije podlubnikov vključuje njihove številne ter zapletene znotrajvrstne in medvrstne povezave z drugimi živimi organizmi, kot so različne oblike simbioz, komenzalizem, antagonizem in mutualizem. Z nalogo smo želeli raziskati povezavo podlubnik–gliva–gostiteljsko drevo. Podlubniki so vektorji gliv, ki jih prenašajo na svojih telesih oziroma se z njimi prehranjujejo in jih z iztrebki prenesejo na novega gostitelja (Harrington, 1993; Paine in sod., 1997). Nekatere vrste podlubnikov prenašajo trose ali dele micelija v posebnih strukturah – mikangijih (Six, 2003). Mikangiji so posebne vdolbine, žepki, ki vsebujejo žleze in sekretorne celice (Harrington, 2005). Mikangije v ožjem smislu besede imajo predvsem podlubniki, ki so odvisni od prehranjevanja z glivami (Harrington, 2005). Podlubniki živijo v asociaciji z različnimi glivami (Harrington, 1993), zlasti s tistimi iz skupine ofiostomatoidnih gliv (Six, 2003). To je ekonomsko pomembna skupina gliv, ki je taksonomsko precej zapletena in vključuje različne robove: *Ophiostoma*, *Grosmannia*, *Ceratocystis* in *Ceratocystiopsis* (Kirisits, 2004). Najpogosteje glive določamo z morfološkimi metodami, vendar so lahko preučevane značilnosti gliv enake pri različnih vrstah ali celo rodovih in jih je tako nemogoče bolj natančno ločiti (Linnakoski in sod., 2010), zato za določitev uporabljamo tudi molekularne tehnike, ki temeljijo na primerjavi določenih zaporedij izbranih odsekov DNA. Za določanje ofiostomatoidnih gliv se uporablja verižna reakcija s polimerazo (PCR) (Kim in sod., 1999; Witthuhn in sod., 1999; Bridge in sod., 2001; Marin in sod., 2009; Villari in sod., 2013).

Nekatere ofiostomatoidne glive skupaj s podlubniki oslabijo drevesa in povzročajo njihovo prezgodnje odmiranje v vseh razvojnih stopnjah. Na drevesu povzročajo obarvanje beljave (od tod tudi drugo ime za to skupino – primarne glive modrivke) in bolezni prevodnega sistema, katerih posledica je lahko propad drevesa (Six, 2003; Lee, 2006; Linnakoski in sod., 2008).

Znanje o ofiostomatoidnih glivah, ki živijo v asociaciji s podlubniki v Sloveniji in drugod, je nepopolno. Gotovo je znanosti še veliko gliv neznanih, prav tako so neraziskane njihova taksonomija, biogeografija, biologija in ekologija. Nejasna je tudi vloga ofiostomatoidnih gliv pri slabitvi obrambnih sistemov gostiteljskega drevesa, povezava med njihovo patogenostjo/agresivnostjo in podlubnikom ter njihov pomen pri odmiranju drevja.

Pričakujemo, da se bodo ofiostomatoidne gliche oziroma škode zaradi njih v gozdovih v prihodnosti pojavljale pogosteje. Kot navaja Friedl (2004), so bile v preteklosti pomemben ekonomski problem le na borih, v zadnjih letih pa so problem tudi na navadni smreki.

Zatorej so bili cilji naše naloge: 1) raziskati vrstno sestavo gliv, ki živijo v asociaciji z najpomembnejšimi podlubniki na navadni smreki (*Picea abies* (L.) Karsten): osmerozobim smrekovim lubadarjem (*Ips typographus* (Linnaeus, 1758)), šesterozobim smrekovim lubadarjem (*Pityophthorus chalcographus* (Linnaeus, 1761)) in malim osmerozobim smrekovim lubadarjem (*Ips amitinus* (Eichhoff, 1871)), ki povzročajo velike škode v slovenskih gozdovih, in 2) ugotoviti patogenost najpogostejših gliv do gostiteljskih dreves. Pričakujemo, da bodo rezultati raziskave uporabni pri gospodarjenju s smrekovimi sestoji v smislu zmanjševanja škod zaradi smrekovih podlubnikov.

Iz tega so sledile naslednje hipoteze:

1. Biodiverziteta ofiostomatoidnih gliv na smrekovih podlubnikih v Sloveniji je pestrejša v primerjavi z vrstno sestavo omenjenih gliv v srednjeevropskih gozdovih.
2. Nekatere gliche, ki živijo v asociaciji s smrekovimi podlubniki v naših razmerah, so patogene, slabijo obrambne sisteme dreves in lahko celo povzročijo sušenje dreves.
 - Patogenost posameznih izolatov asociacijskih gliv smrekovih podlubnikov je različna.
 - Virulentnost gliv, ki živijo v povezavi s smrekovimi podlubniki, se spreminja in je odvisna od lastnosti posameznih dreves smreke.

3. Patogenost asociacijskih gliv je sprožilni dejavnik, ki pri napadu smrekovih podlubnikov še dodatno poveča njihovo agresivnost in posledično sušenje smrekovih sestojev.
4. Asociacija gliv z določenimi vrstami podlubnikov zaradi medsebojne vrstno specifične navezanosti predstavlja koevolucijsko mutualistično simbiozo.

2 PREGLED OBJAV

2.1 GLIVE

2.1.1 Taksonomija

Ofiostomatoidne glive so skupina gliv, ki temelji na enaki morfologiji. S skupnim imenom jih je poimenoval Upadhyay (1993). V skupini je do sedaj poznanih okoli 200 vrst gliv iz debla zaprtotrosnic ali Ascomycota (Index Fungorum; Linnakoski, 2011). Skupina vključuje naslednje rodove: *Ophiostoma* Syd. & P. Syd., *Ceratocystis* Ellis & Halst., *Ceratocystiopsis* H. P. Upadhyay & W.B.Kendr., *Grosmannia* Goid. in njihove anamorfe: *Leptographium* Lagerb. & Melin, *Pesotum* J. L. Crane & Schokn., *Sporothrix* Hektoen & C. F. Perkins, *Hyalorhinocladiella* H.P. Upadhyay & W.B. Kendr., *Thielaviopsis* Went, *Chalara* (Corda) Rabenh., *Graphium* Corda (Wingfield in sod., 1993; Kirisits, 2004).

V nadaljevanju so predstavljene ofiostomatoidne glive po filogenetskem konceptu. Dva najbolj značilna rodovala skupine, *Ophiostoma* in *Ceratocystis*, pripadata različnim redovom debla Ascomycota (Samuels, 1993; Wingfield in sod., 2006). Glive iz rodov *Ophiostoma* in *Ceratocystis* kot tudi iz rodov *Ceratocystiopsis* in *Grosmannia* so si morfološko zelo podobne, vendar pa so filogenetske študije na osnovi analiz zaporedij rDNA pokazale, da je skupina polifiletična. Rod *Ophiostoma* je uvrščen v monofiletično skupino, ki ni v bližnjem sorodstvu z rodom *Ceratocystis* (Hausner in sod., 1993; Okada in sod., 1998; Wingfield in sod., 2006). Rod *Ophiostoma* je filogenetsko razvrščen v družino Ophiostomataceae, red Ophiostomatales, podrazred Sordariomycetidae, razred Sordariomycetes, deblo Ascomycota, kraljestvo Fungi (Kirk in sod., 2008). *Ceratocystis* pa je rod, ki pripada družini Ceratocystidaceae, red Microascales, podrazred Hypocreomycetidae, razred Sordariomycetes, deblo Ascomycota, kraljestvo Fungi (Kirk in sod., 2008). Rodova *Grosmannia* in *Ceratocystiopsis* se razlikujeta od rodu *Ophiostoma*, vendar se prav tako uvrščata v red Ophiostomatales glede na multigensko filogenetsko raziskavo, ki so jo napravili Zipfel in sod. (2006).

V nadaljevanju predstavljamo podatke iz literature, ki obravnavajo razlike ofiostomatoidnih gliv glede na morfologijo spolnih (teleomorf) in nespolnih (anamorf) stadijev. Redovi ofiostomatoidnih gliv se med seboj razlikujejo na podlagi spolnih stadijev. Anamorfi gliv so si zelo različni ena vrsta jih ima lahko več (Malloch in Blackwell, 1993). Vrste rodu *Ceratocystis* imajo nespolni stadij iz redu *Thielaviopsis* (Seifert in sod., 2006), do nedavnega uvrščen skupaj z rodом *Chalara* (Kirisits, 2004). Nespolni stadij rodu *Ophiostoma* spada v različne rodove nepopolnih gliv: *Sporothrix*, *Hyalorhinocladiella* in *Pesotum*. Konidiji rodu *Hyalorhinocladiella* se razvijejo iz anelide, odcepijo se z zakasnitvijo in tako je razvoj lahko zmotno videti kot simpodialen (Benade in sod., 1995). Ker obstajajo vmesne razvojne oblike, na podlagi morfoloških značilnosti težko ločimo anamorfa rodu *Hyalorhinocladiella* in rodu *Sporothrix* (Benade in sod., 1995; Aghayeva in sod., 2004). Vrste rodu *Pesotum* imajo v sveženj urejene konidiofore, kar imenujemo tudi cinema. V preteklosti so ga zamenjevali z rodom *Graphium*, sedaj pa sta ta dva rodu ločena (rod *Graphium* je uvrščen v razred Microascales) na podlagi različnih razvojev konidijev (Okada in sod., 1998) in na podlagi analize z molekularnimi markerji. Razvoj konidijev poteka eksogeno, in sicer na vrhu konidiogene celice (Samuels, 1993; Kirisits, 2004). Tudi rod *Ceratocystiopsis* ima anamorfe iz rodu *Hyalorhinocladiella* in rodu *Sporothrix*, ne pa iz rodu *Pesotum* (Samuels, 1993; Kirisits, 2004; Zipfel in sod., 2006). Rod *Leptographium* je anamorf rodu *Grosmannia*, konidiofori pa se razlikujejo od vegetativnih hif (Seifert in sod., 2006). Anamorfe torej ločimo glede na strukturo konidiofora in glede na razvoj konidijev (Benade in sod., 1995; Okada in sod. 1998; Jacobs in Wingfield, 2001).

Vrste rodov *Ceratocystis* in *Ophiostoma* imajo teleomorfe, ki jih je zelo težko ločiti, in precej različne anamorfe (Kirk in sod., 2008). Lahko pa jih ločimo tudi po drugih značilnostih. Vrste rodu *Ophiostoma* so odporne proti visokim koncentracijam antibiotika cikloheksimid, v celičnih stenah imajo vgrajeno celulozo, ramnozo in hitin, medtem ko jih vrste *Ceratocystis* nimajo in so občutljive za antibiotike (Samuels, 1993; Jacobs in Wingfield, 2001). Vrste rodu *Ophiostoma* primarno najdemo na lesnatih rastlinah, vrste *Ceratocystis* pa na širokem naboru lesnatih ali zelnatih rastlin v zmernih in tropskih predelih (Six, 2003). Vrste rodu *Ceratocystis* pogosteje kot vrste rodu *Ophiostoma*

povzročajo rastlinske bolezni (Six, 2003). Poznani patogeni iz rodu *Ceratocystis* so: *Ceratocystis fagacearum* (Bretz) J. Hunt, *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halst., *Ceratocystis platani* (J. M. Walter) Engelbr. & T. C. Harr. (=*Ceratocystis fimbriata* f. *platani* C. May & J.G. Palmer), *Ceratocystis couraelescens* (Münch) B.K. Bakshi. Najbolj poznan in uničujoč patogen iz rodu *Ophiostoma* pa je *Ophiostoma ulmi* (Buisman) Nannf. in *Ophiostoma novo-ulmi* Brasier, ki sta izredno patogeni glivi na nekaterih vrstah brestov (*Ulmus* spp.). Glivi povzročata bolezen odmiranje brestov ali holandsko brestovo bolezen, ki povzroča epidemijo na brestih v Evropi in Severni Ameriki (Kirisits, 2013).

2.1.2 Morfološke značilnosti ofiostomatoidnih gliv

Značilnost ofiostomatoidnih gliv so podolgovati trosonosci ali konidiofori, ki apikalno (vršno) proizvajajo množico sluzastih trosov na vrhu dolgih steljk (Wingfield in sod., 1993; Seifert in sod., 2006). Konidiofori so lahko posamični ali v skupinah, imenujemo jih sinema. Razmnoževalne strukture so si med seboj lahko zelo podobne (Kirisits, 2004). V nadaljevanju bomo opisali splošne značilnosti spolnih in nespolnih struktur ofiostomatoidnih gliv.

Askokarpi imajo spodnje dele kroglaste, ovalne do hruškaste. Lahko so delno ali v celoti temni, hialini ali svetlo obarvani. Obstajajo taki, ki imajo ostiol (peritecij) ali so popolnoma zaprti (kleistotecij). Največkrat imajo dolge vratove, ki se občasno končujejo z resastimi ostiolarnimi hifami (Upadhyay, 1981; Kirk in sod., 2008). Aski se razvijajo po osrednjem delu trosiča in so različnih oblik – vretenasti, kljunasti do kroglastih. Askospore so različnih oblik, hialine in navadno enocelične, redko so dvocelične s sredinsko septo (Upadhyay, 1981; Wingfield in sod., 1993; Kirisits, 2004; Kirk in sod., 2008). Mnoge vrste imajo askospore z večplastno steno, ki je pod mikroskopom videti kot želatinast ovoj (Upadhyay, 1981; Kirk in sod., 2008). Skozi dolge vratove peritecijev se izločajo v sluzastih kapljicah (Upadhyay, 1993).

Morfologija nespolnih struktur, konidioforov, je bolj raznolika, kot smo opisali že prej, v zgradbi konidioforov in v nastanku konidijev (Jacobs in Wingfield, 2001). Konidiofori so

lahko veliki, posamezni z obarvanimi steljkami (*Leptographium*). Lahko so tudi zelo podobni vegetativnim hifam (npr. *Sporothrix*), niso tako razviti, redkeje so obarvani in tvorijo trose z brstenjem kot kvasovke. Rod *Pesotum* ima konidiofore sestavljene iz skupine pokončnih konidioforov, sinema (Harrington, 1992). Konidiji pa so najpogosteje hialini, in sicer so okrogli, ovalni ali valjasti (Six, 2003).

Ker imajo vrste iz rodov *Ceratocystis*, *Ophiostoma*, *Ceratocystiopsis* in *Grosmannia* enak način prenosa z gostitelja na gostitelja, to je z vektorji – žuželkami, so neodvisno druga od drugega razvile podobne askokarpe (Harrington, 1993; Six, 2003; Kirisits, 2004).

2.1.3 Določanje gliv z molekularnimi tehnikami

Večinoma glive še vedno določamo na klasičen način, tj. glede na morfološke znake. Ena izmed pomanjkljivosti takega določanja je, da se ena vrsta glive pogosto pojavlja v več oblikah. Tako imajo številne glive zlasti iz debla Ascomycota izrazit pleomorfizem ali polimorfizem, tj. da tvorijo nespolne (ene ali celo več oblik) in spolne trose. Iste vrste, včasih celo isti osebki se lahko razmnožujejo na dva načina: spolno, torej z mešanjem genov s partnerjem iste vrste, ali nespolno, tj. s kloniranjem; v tem primeru imajo gensko identične potomce. Zaradi tega se pojavlja tudi zmešnjava v poimenovanju gliv, ki temelji na biološki klasifikaciji, katere utegeljitelj je Carl Linnaeus. Ena gliva je lahko poimenovana dvakrat, in sicer glede na spolno in glede na nespolno obliko. Pojavilo se je gibanje za enotno poimenovanje gliv (One Fungus = One Name). Znanstveniki so s pojavom molekularnih orodij, ki temeljijo na zaporedjih DNA, dobili možnost, da nedvoumno potrdijo, da sta spolna in nespolna oblika glive v bistvu ena sama vrsta (Taylor, 2011).

Samo morfološko določanje ofiostomatoidnih gliv ni zadostno ravno zaradi prekrivajočih se znakov med vrstami, opisanih v poglavju 2.1.2 (Linnakoski, 2011). Značilno za ofiostomatoidno skupino gliv je, da so zelo dolgo veljale za sinonim oziroma vrste enega rodu, zato sta določanje in razlikovanje teh gliv težavna. Posledično je uporaba molekularnih metod za identifikacijo in prepoznavanje gliv nepogrešljiva, s primerjavo

molekularnih markerjev, ki temeljijo na genetiki, pa je, kot navajajo Kirk in sod. (2008), postalo jasno, da običajne fenotipske metode, ki temeljijo na morfoloških značilnostih, ne zadoščajo več današnjim zahtevam določanja. S sodobnimi molekularno-genetskimi metodami pa so celo dokazali, da so rodovi filogenetsko oddaljeni drug od drugega. Pomembno je, da se te novejše metode še vedno uporabljajo skupaj z osnovnim znanjem ekologije in taksonomije glive, ki jo preučujemo, saj molekularne metode, ki temeljijo na analizi samo enega gena, ne morejo popolnoma nadomestiti klasičnih taksonomskeh metod (Linnakoski, 2011), lahko pa postopke poenostavijo ter prispevajo k objektivnosti in preglednosti, raziskovalcem pa omogočijo, da delajo z večjo količino vzorcev.

Molekularne metode, ki temeljijo na analizi nukleinskih kislin DNA (deoksiribonukleinska kislina) in RNA (ribonukleinska kislina), lahko zajemajo analizo celotnega genoma oz. vključujejo krajše odseke genoma (Zalar in Gunde Cimerman, 2002). Določanje nukleotidnega zaporedja genomske DNA organizmov je prineslo velik napredek pri razumevanju strukture, funkcionalnosti, organizacije, odnosov in razvoja genov različnih organizmov (Gril, 2009). Dandanes so že objavljena nukleotidnega zaporedja celotnega genoma, tudi slovenskih ofiostomatoidnih gliv. Analizo je opravila Lah s sodelavci (2013) na vrsti *Ceratocystis polonica* (Siemaszko) C. Moreau in vrsti *Ophiostoma bicolor* R. W. Davidson & D. E. Wells, ki smo jih izolirali v tej raziskavi. Identificirali so 6405 genov vrste *C. polonica* in 7746 genov vrste *O. bicolor*. Preiskovali so specifične gene, ki kodirajo encime, pomembne za odpravljanje in spremicanje obrambnih sistemov gostiteljskih dreves.

Dve pomembni tehnični pridobitvi sta spodbudili raziskave na podlagi analize DNA. Prva je bila verižna reakcija s polimerazo (PCR, angl. Polymerase Chain Reaction), ki omogoča analizo majhnega števila glivnih celic ali celo eno samo celico, npr. tros, posušen herbarijski material ali izumrl organizem (Kang in sod., 1998). Druga pa je bil izbor univerzalnih oligonukleotidnih začetnikov, specifičnih za glive, ki omogoča dostop do nukleotidnih sekvenč (Guarro in sod., 1999). Prednosti markerjev DNA so, da DNA najdemo v praktično vseh celicah vseh organizmov, lahko jih pridobimo tako iz živih kot iz mrtvih tkiv, tkiva je lahko shranjevati, za analizo večine markerjev DNA pa je potreben le nanogram snovi (Innis in Gelfand, 1990). Najprej moramo iz materiala izolirati DNA.

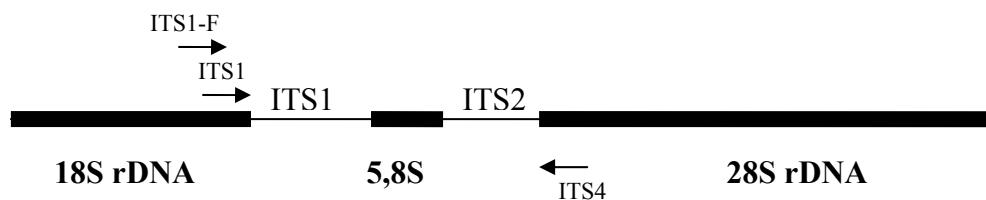
Nato nadaljujemo z metodo PCR, ki se izvaja po natančnih protokolih in je popolnoma avtomatizirana. Niz korakov segrevanja in ohlajanja omogoča pomnoževanje DNA. Pri visoki temperaturi pride do denaturacije DNA, čemur sledi vezava oligonukleotidnih začetnikov; nove dodatne verige se oblikujejo z dodajanjem dNTP (deoksinukleozid trifosfat) ob termostabilni polimerazi DNA (npr. Taq-polimeraze). Nadaljnje segrevanje denaturira novi dimer in proces se ponavlja skozi številne cikle.

Metodi PCR lahko sledi sekvenciranje DNA ali določanje zaporedja DNA. To je določanje zaporedij baz v dani regiji DNA. Večina analiz zaporedij se opravlja na osnovi Sangerjeve metode zaključevanja verig, čeprav se razvijajo tudi alternativne metode. Pridobljena zaporedja se lahko uporabijo za filogenetske analize, vključujuč že poznane sekvence, ki jih najdemo na spletu v posebnih podatkovnih zbirkah (Kirk in sod., 2008).

Svetovne podatkovne zbirke genetskih zaporedij so razložene zbirke vseh znanih in javno dostopnih zaporedij nukleotidov in proteinov. Podatki v teh zbirkah največkrat predstavljajo posamezna sosedna zaporedja DNA in RNA z razlagami. Podatki so razvrščeni v razdelke, ki temeljijo na filogeniji ali na tehničnih postopkih, s katerimi so pridobili informacijo o zaporedjih. Vsi podatki se zbirajo prek izvirnih avtorjev, ki jih pošiljajo neposredno, največkrat kot del procesa objave. Obstajajo tri velike spletne banke podatkov, in sicer GenBank (ZDA), DNA Data Bank of Japan (DDBJ) in European Molecular Biology Laboratory (EMBL). Vsi trije centri predstavljajo ločene točke za pošiljanje podatkov, vendar pa si vsi trije centri dnevno izmenjujejo podatke in s tem ustvarjajo enotno bazo, ki je na voljo širši javnosti (Baxevanis in sod., 2001).

V podatkovnih zbirkah najdemo najbolj pogoste ofiostomatoidne glive na navadni smreki *Ophiostoma piceae* (Münch) Syd. & P. Syd., *O. bicolor*, *Ophiostoma ainoae* H. Solheim, *Graphium fimbriisporum* (M. Morelet) K. Jacobs, Kirisits & M. J. Wingf., *Ophiostoma piceiperda* (Rumbold) Goid., *Grosmannia penicillata* (Grosmann) Goid., *Grosmannia cucullata* (H. Solheim) Zipfel, Z.W. de Beer & M. J. Wingf., *C. polonica* in njihova zaporedja: zapis za 26S rRNA, zapis za odsek ITS rDNA, zapis za 5,8S rRNA, 28S ali velika podenota rRNA, zapis za β-tubulin gen, zapis za 18S ali mala podenota rRNA, zapis za aktin gen.

Iz podatkovnih zbirk je razvidno, da so raziskave ofiostomatoidnih gliv najbolj osredotočene na genski sklop ribosomske RNA (rRNA) oziroma njeno matrico, ribosomalno DNA (rDNA). Ribosomalna DNA sestoji iz ponovljivih zaporedij. Vsaka enota (slika 1) je sestavljena iz nukleotidnega zaporedja za majhno podenoto ribosomalno DNA 18S rRNA SSU (angl. Small Ribosomal Subunit) in veliko ribosomalno podenoto – 28S rRNA ali LSU (angl. Large Ribosomal Subunit), regijo notranjih prepisnih vmesnikov ITS1 in ITS2 (angl. Internal Transcribed Spacer) in podenoto 5'8S rRNA ter podenoto 5S rRNA (Zalar in Gunde Cimerman, 2002; Bridge in sod., 2001). Lee (2006) pojasnjuje, da je taksonomska pozicijo glivnih vrst mogoče razložiti s filogenetskimi odnosi z drugimi taksoni gliv. Tandemske ponovitve regije rDNA so najbolj natančno preučevane regije za filogenetske informacije. Geni za 5,8S, velika 28S- in majhna 18S-jedrana podenota, so se spremenjali počasi in so evolucijsko stabilnejši, tako da je te sekvene možno primerjati za preučevanje daljnjih odnosov (družine, razredi, debla). Nasprotno se vmesne nekodirajoče enote ITS1 in ITS2 med podenotami evolucijsko nestabilne ter se spremenjajo hitro, vsebujejo pa tudi več variacij, kar omogoča primerjavo med rodovi in vrstami (White in sod., 1990).



Slika 1: Položaj treh kodirajočih 18S, 5,8S, 28S in dveh medgenskih regij notranjega prepisnega vmesnika ITS1 in ITS2 ter mesta naleganja oligonukleotidnih začetnikov ITS1-F, ITS1 in ITS4

Figure 1: The three coding 18S, 5,8S, 28S and two internal transcribed spacer region (ITS1 and ITS2) of the nuclear ribosomal DNA

Poleg rDNA se za raziskavo filogenije gliv uporabljajo tudi nukleotidna zaporedja genov, ki kodirajo proteine: β -tubulin, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazo, elognacijski faktor in aktin. Posebej za ofiostomatoidne vrste z anamorfom iz rodu *Leptographium* velja, da so filogenetska drevesa, izračunana na osnovi zapisov genov, ki kodirajo proteine v

primerjavi s filogenetskimi drevesi izračunanimi na osnovi rDNA zaporedij, bolj natančna (Lee, 2006).

Najpogosteje se uporablja polimerazna verižna reakcija (PCR) in specifični oligonukleotidni začetniki za takson. Uspešnost reakcije PCR je odvisna od tega, ali smo uporabili pravi set oligonukleotidnih začetnikov in ali so razmere ustrezne za reakcijo (Kendrick, 2003). Vrstno specifični PCR ali vrstno specifični oligonukleotidni začetniki, ki temeljijo na razlikah sekvenc med vrstami gliv, so zanesljiva metoda za točno in hitro določanje. Uporablja se za pojasnitev odnosov med vrstami in za razločitev morfološko zelo podobnih oz. kriptičnih vrst. Npr. dve morfološko podobni vrsti iz rodu *Ophiostoma*, *O. piceae* in *O. quercus* je mogoče natančno razlikovati z uporabo vrstno specifičnih oligonukleotidnih začetnikov (Lee, 2006; Seifert in sod., 2006).

Sledi sekvenciranje, ki je večinoma avtomatizirano in se opravlja s kapilarno ali gelsko tehniko. Pred tem se v gen vključi označene baze, ki omogočajo, da se preberejo zaporedja baz. Sekvenciranju sledi analiza z različnimi programskimi orodji za analiziranje in poravnavanje zaporedij (Kendrick, 2003). Pridobljena zaporedja moramo poravnati, če jih želimo primerjati. Največkrat poravnava poteka postopoma, združuje najbolj sorodni zaporedji in tvori novo samostojno zaporedje, tega pa primerja z drugimi zaporedji. Postopek se ponavlja tako dolgo, da ostaneta le dve zaporedji (Baldauf, 2003). Obstajajo različni programi, ki jih lahko uporabimo za poravnavo (T-coffee, Bioedit, Clustal W oz. Clustal X. (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)

Na koncu izrišemo še filogenetsko drevo, ki nam grafično predstavi odnose med preiskovanimi nukleotidnimi zaporedji v obliki dvodimenzionalnega grafa. Analiziramo podatke in jih uvrstimo v sistem, ki predstavlja sorodstvene odnose, upoštevajoč podatke, ki jih imamo na voljo. Vsa drevesa so le predvidevanja sorodstvenih odnosov med preučevanimi taksoni. Filogenetska drevesa lahko koreninimo ali ne (Baldauf, 2003). Pri koreninjenih drevesih korenino predstavlja skupni prednik vseh taksonov, ki so na drevesu. Pri nekoreninjenih drevesih pa skupnega prednika ne poznamo. To pomeni, da pri nekoreninjenem drevesu ne moremo vedeti, kako si preučevani taksoni sledijo dobimo le informacije o odnosih med njimi.

Metode za izračun filogenetskih dreves lahko v grobem razdelimo na tiste, ki temeljijo na lastnostih oz. stanjih znakov danih organizmov, brez razumevanja evolucijskih mehanizmov (fenetične metode) in tiste, ki temeljijo na izračunanih razvojnih razdaljah med danimi organizmi; med izračuni izberemo optimalnega (kladistične metode). Za izris filogenetskega drevesa se najpogosteje uporablajo distančna metoda (angl. Distance Method), metoda največje varčnosti (angl. Maximum Parsimony Method) in metoda največjega verjetja (angl. Maximum Likelihood Approach).

2.1.4 Bolezni gostiteljskih dreves, ki jih povzročajo ofiostomatoidne glive

Povezano podlubnik–gliva–gostiteljsko drevo je zelo težko obravnavati delno, saj sestavlja celoten trofični kompleks (Lee, 2006). Za razumevanje povezave med podlubniki in glivami moramo upoštevati vpliv gostiteljskih dreves. Govorimo o odpornosti ali rezistenci gostiteljskih rastlin. Rastline so proti določenim patogenim organizmom specifično odporne, proti drugim pa so specifično občutljive. Pri specifični odpornosti razlikujemo aktivno in pasivno (statično) odpornost. Iglavci, ki so najpogostejši gostitelji ofiostomatoidnih gliv (Kirisits, 2004; Linnakoski in sod., 2008), vključujejo različne strategije obrambe specifične odpornosti; govorimo o vgrajenem (pasivna ali statična odpornost) in sproženem obrambnem odzivu (aktivna odpornost) (Hudgins in Franceschi, 2004; Ralph in sod., 2006; Zheng in Dicke, 2008). Pasivna odpornost (preinfekcijska odpornost, psevdoinmunost ali aksenija – negostoljubnost) temelji na lastnostih rastline, ki parazitu onemogočajo, da prodre v rastlino ozziroma se v njej razvija (Maček, 2008). Pasivna obramba rastlin predstavlja plutaste in olesenele derivate periderma, skleridne celice ali celične plasti, celjenje periderma (Franceschi in sod., 2000). To je prva faza obrambe, ki odbija ali zavira napad (Krokene in Fossdal, 2006).

Ker ima lahko posamezna rastlina veliko število patogenov oz. napadalcev, je nemogoče imeti vgrajene obrambne mehanizme proti vsakemu izmed njih. Poleg tega je nemogoče predvideti, ali bodo potencialni napadalci dejansko napadli rastlino. Rastlinojede žuželke in glive pa se lahko tudi prilagodijo vgrajeni rastlinski obrambi (Zheng in Dicke, 2008). Zato napadu sledi aktivna (postinfekcijska) odpornost, ki je reakcija rastline na delovanje

patogena oz. napadalca. To so obrambne ali imunitetne reakcije, ki skušajo onemogočiti aktivnost parazita po vdoru (Maček, 2008). Aktivna odpornost zahteva manjše vložke rastlinskih virov, vendar mora biti aktivirana zelo hitro, da je učinkovita (Taiz in Zeiger, 2006). Vključuje sekundarno sintezo smole ter proizvodnjo zaščite na osnovi fenolov in proteinov (Hudgins in Franceschi, 2004; Taiz in Zeiger, 2006). Nekaj dni po prvem napadu se odpornost drevesa poveča, kar poznamo kot sistemsko pridobljeno odpornost (Taiz in Zeiger, 2006).

Ob mehanski poškodbi sta živi del skorje in periferni del funkcionalne beljave izpostavljena invazivnim zunanjim vplivom, ki jim pogosto sledi okužba s patogenimi organizmi (Vek, 2013). Drevesa ob poškodbi sprožijo proces kompartmentalizacije, s katerim poskušajo oddeliti oz. zapreti območje poškodbe. Koncept kompartmentalizacije pomeni, da se ob ranitvi sproži zaporedje anatomskih sprememb v drevesu. Okoli rane se tvorijo "stene", s katerimi se izolirajo poškodovani deli drevesa in se ustvari vodotesen oddelek ali kompartment. Ustavlja ali preprečuje se širjenje patogenih organizmov in posledično propad drugih delov drevesa. Proces kompartmentalizacije poteka po modelu omejitve razkroja v drevesu CODIT (Compartmentalization Of Decay In Trees), katerega utemeljitelja sta Shigo in Marx (1977). Model CODIT zajema časovni in prostorski del (Vek, 2013). Časovni del poteka v treh stopnjah. Stopnja 1 vključuje procese, povezane z neposrednim odzivom drevesnih tkiv na poškodovanje, to so abiotske spremembe, izsuševanje in vdor kisika v vaskularno tkivo, ter fiziološke, biokemične in kemične spremembe. V stopnji 2 nastopi kolonizacija zaščitnega lesa (diskoloracije, jedrovine) in beljave s pionirskimi bakterijami, pri čemer naj bi primarni metabolizem celice nadomestil vzbujeni sekundarni metabolizem. Biološki razkroj nastopi v stopnji 3, ki ga povzročijo glive razkrojevalke lesa. V tej fazi les izgubi oporno funkcijo. Prostorski del zajema prostorski razvoj diskoloracije in biološkega razkroja, ki sledi poškodbi. Tudi ta del lahko razdelimo na dva dela. Prvi del predstavlja tri stene modela, drugi pa predstavlja četrta stena. Steni 1 in 4 nastaneta po poškodbi, 2 in 3 pa sta definirani s strurnimi lastnostmi lesa. Stena 1 predstavlja bariero, ki preprečuje širjenje okužb v aksialni smeri. Je rezultat aktivnega odziva ksilemskega tkiva (tile, gumozni depoziti, ekstraktivne odložnine, smola pri iglavcih). Stena 2 zavira razvoj učinkov v radialni smeri (plast gostejšega lesa v braniki). Stena 3 zavira razvoj infekcije v tangencialni smeri, tvori jo

radialno usmerjeno trakovno tkivo. Stena 4 ali barierna cona je glavni element modela CODIT, ki jo tvori kambij po ranitvi; omejuje širjenje dikoloracije in biotske infekcije v prirastne plašče (Torelli in sod., 1988).

Večinoma so ofiostomatoidne vrste gliv saprofiti ali šibki paraziti (Harrington, 1993; Seifert, 1993). Med njimi pa je tudi precejšnje število patogenov dreves in zelnatih rastlin, ki so ekonomsko pomembni (Kirisits, 2004; Harrington, 1993). Patogene glive lahko preživijo in se razvijajo v živih rastlinah ter največkrat povzročajo bolezni gostitelja. Te glive so sposobne premagati zapletene obrambne sisteme rastlin (Knogge, 1998; Maček, 2008). Patogenost gliv se torej nanaša na sposobnost glive, da preživi in se razvije v živih rastlinah ter povzroči bolezen (Agrios, 1988; Shaner in sod., 1992). Patogenost se meri z virulenco, ki je stopnja patogenosti glive oz. njena relativna sposobnost, da poškoduje gostitelja (Shaner in sod., 1992); lahko rečemo, da je to resnost povzročene bolezni (Matusick, 2010). Patogenost je lastnost patogenega organizma, za razliko od virulence, ki je odvisna tudi od obrambnih sposobnosti gostiteljske rastline.

Ofiostomatoidne glive pogosto povzročajo rastlinske bolezni, kot so vaskularne bolezni, in obarvanost beljave dreves gostiteljic (Harrington, 1993; Harrington in Wingfield, 1998; Kirisits, 2013). Patogene ofiostomatoidne glive lahko delimo na patogene obarvanja beljave, sistemske vaskularne patogene uvelosti in nesistemske vaskularne patogene modrenja (Kirisits, 2004). Predvideva se, da so drevesa bolj dovezetna za napade podlubnikov, in sicer prav zaradi njihove asociacije z ofiostomatoidnimi glivami (Christiansen in sod., 1987; Horntvedt in sod., 1983; Farrel, 2001). Glive slabijo obrambne mehanizme dreves, kar podlubnikom omogoča lažjo kolonizacijo gostiteljskih dreves (Kirisits, 2009; Paine in sod., 1997; Raffa in Klepzig, 1992). Ofiostomatoidne glive s svojo hitro rastjo (3–10 milimetrov na dan) obidejo obrambno smoljenje iglavcev in tako hitro blokirajo smolne kanale (Paine in sod., 1997, Farrell, 2001). Nekatere glive celo premagajo odpor zdravega gostiteljskega drevesa in povzročajo njegovo odmrtje (Gibbs, 1993; Solheim, 1993). Največkrat drevesa ne odmrejo popolnoma, ampak glive le zmanjšajo vrednost lesa in sprožijo stres v drevesu.

2.1.4.1 Patogeni obarvanja beljave

Obarvanje beljave je definirano kot modro, sivkasto do črno obarvanje, ki ga povzročijo glice, ki prodirajo v beljavo, vendar ne poslabšajo mehanskih lastnosti lesa (Gibbs, 1993; Seifert, 1993). Zaradi tega je večkrat v rabi tudi njihovo drugo ime – primarne glice modrivke. Omenjene glice prenašajo podlubniki na ustrezен substrat. Glice kolonizirajo rovne sisteme podlubnikov in sosednjo beljavo ter povzročajo obarvanje beljave (Jankowiak in Hilszczański, 2005; Linnakoski in sod., 2008). Pigment, ki povzroča obarvanje, je glivni melanin v stenah glivnih celic (Seifert, 1993). Barva celičnih sten hif je rjava, vendar se zaradi interference svetlobe opazi kot sivo, modro ali črno obarvanje (Maček, 2008). Micelij raste v parenhimskih celicah, redkeje v traheidah. V splošnem glice niso sposobne prodreti skozi celično steno gostiteljske rastline, ampak se iz celice v celico širijo skozi celične reže (Seifert, 1993; Maček, 2008). Les ne izgubi pomembnih tehničnih lastnosti, ker glice ne razgradijo glavnih sestavin celičnih sten, kajti primarne glice modrivke nimajo encimov za razgradnjo lesa (Maček, 2008). Kljub temu pa se spremeni estetska vrednost lesa in posledično lahko pade vrednost hlodovine, kar povzroča izgube v lesni industriji, v nekaterih primerih pa se obarvan lesi prodaja celo po višjih cenah, npr. v Severni Ameriki obarvani les prodajajo pod komercialnim imenom Denim PineTM. Obarvanje lesa povzročajo različne ofiostomatoidne glice: *O. piceae*, *Ophiostoma piliferum* (Fr.) Syd. & P. Syd., *Ophiostoma plurianulatum* (Hedg.) Syd. & P. Syd., *Ophiostoma minor* (Hedg.) Syd. & P. Syd., *C. coerulescens*, *C. fimbriata*, *C. fagacearum* (Nkuekam, 2007).

2.1.4.2 Sistemski vaskularni patogeni uvelosti – traheomikoze

Veliko vrst ofiostomatoidnih gliv, ki živijo v povezavi s podlubniki, je patogenih. S pomočjo podlubnikov ali abiotskih dejavnikov (veter, dež idr.) se prenašajo z gostiteljskega drevesa na drugega gostitelja. Najbolj agresivni patogeni so tisti, ki povzročajo uvelosti – bolezni prevodnega sistema gostiteljskih dreves (Kirisits, 2004). Okužijo vaskularni sistem živih dreves, kar vodi do motenj vodnega transporta in posledično do propada dreves (Harrington, 1992; Kirisits, 2004). Te glice povzročajo

nastanek til – vrečastih zamaškov iz parenhimskih celic v notranjosti sosednjih trahej gostiteljskih dreves. Tile lahko delno ali v celoti zamašijo prevodne elemente. Preprečujejo dovod vode do listov poganjkov v obrši, zato ti venejo. Najbolj znana bolezen prevodnega sistema je odmiranje brestov ali holandska brestova bolezen, ki jo povzročata glivi *O. ulmi* in *O. novo-ulmi*, katerih vektorji so različne vrste podlubnikov iz rodu *Scolytus* (Nkuekam, 2007; Kirisits, 2013). V 20. stoletju je bolezen povzročila veliko epidemijo na brestih v Evropi in Severni Ameriki.

2.1.4.3 Nesistemski vaskularni patogeni modrenja

Vse ofiostomatoidne glive niso tako nevarne kot zgoraj opisani patogeni uvelosti, vendar pa imajo lahko kljub temu določeno stopnjo virulence in so sposobne uničiti gostiteljsko drevo, če so vnesene v večjih količinah (Horntvedt in sod., 1983; Christiansen, 1985; Christiansen in sod., 1987; Paine in sod., 1997). Delovanje patogenov modrenja, pogosto v povezavi z žuželkami, povzroča uničenje obrambnega sistema gostitelja, smrt floema in obarvanje lesa (Kirisits, 2004). Nekatere primarne glive modrivke so zelo patogene in so povezane s specifičnimi podlubniki. Ena izmed najbolj pogostih asociacijskih gliv podlubnika *I. typographus* na navadni smreki je gliva *C. polonica*; skupaj povzročata škodo na gostiteljskem drevesu (Solheim, 1992b; Kirisits, 2004).

Patogeni, ki povzročajo bolezni, so grožnja ekonomski vrednosti gozda in hlodovine (Maček, 2008). Ofiostomatoidne glive – vedno skupaj s svojimi vektorji podlubniki (Kirisits, 2013) – poškodujejo in s svojim delovanjem uničijo drevesa v vseh razvojnih fazah, zaradi česar so večkrat potrebne sanitарne sečnje. Prezgodnji, torej nenačrtovani posek zmanjša donos lesa na površino (Maček, 2008). Večje količine lesa na trgu povzročijo padec cen lesa (Košir in Krč, 2007). Neposredni gospodarski učinek na gozdove je povezan z zmanjšano učinkovitostjo proizvodnje zaradi patogenov obarvanja beljave, sistemskih vaskularnih patogenov uvelosti in nesistemskih vaskularnih patogenov modrenja.

2.1.4.4 Testi patogenosti ofiostomatoidnih gliv

Patogenost ofiostomatoidnih gliv lahko ocenimo z inokulacijami odraslih dreves ali inokulacijami sadik. Glive z inokulacijami vnesemo v gostitelja, in sicer v veliko inokulacijskih točkah s t. i. množičnimi inokulacijami (Horntvedt in sod., 1983; Kirisits, 1998; Krokene in Solheim, 1998a; Solheim, 1988) oziroma v malo inokulacijskih točkah ali s t. i. posamičnimi inokulacijami (Sallé in sod., 2005). Prav tako lahko z glivami inokuliramo sadike (Krokene in Solheim, 1998b; Jankowiak in Kolařík, 2010). Gliva skozi inokulacije kolonizira in poškoduje drevo. Skozi umetno ustvarjeno rano vstopi v floem in beljavo. Rezultate inokulacijskih študij smo v naši raziskavi nadgradili s Kochovimi postulati, ki se uporablajo za potrditev vzorčne zveze med glivo in poškodbami gostiteljev (Agrios, 1988). Potek Kochovih postulatov:

- mikroorganizem moramo izolirati iz gostiteljskega organizma,
- izolat moramo gojiti v laboratoriju v čisti kulturi,
- čisto kulturo vnesemo v zdrav gostiteljski organizem, kjer mora povzročiti bolezenska znamenja,
- iz okuženega gostiteljskega organizma moramo ponovno izoliramo isti mikroorganizem, ga gojiti v čisti kulturi in ga določiti.

Drevesa se ob inokulaciji branijo z različnimi strategijami (glej 2.1.4), ki delujejo z anatomske, kemične ali biokemične mehanizmi (Ralph in sod., 2006). V nadaljevanju opisujemo odziv iglavcev na inokulacije, saj se odziv glede na drevesno vrsto razlikuje. Najprej se iz smolnih kanalov sprosti smola, kasneje pa se lahko pojavi tudi drugotno smoljenje (Horntvedt, 1983; Matusick, 2010). Odziv na povzročene rane je akumulacija fungicidnih sestavin in morfoloških sprememb, ki pomagajo pri celjenju ran (Viiri in sod., 2001). Patogenost, ki je odvisna od rezistence gostiteljske rastline, ki jo povzroči gliva, je določena z merjenjem razvoja vidnih simptomov, ki se razvijejo na gostiteljskem drevesu. Simptomi so: dolžina nekroz, površina obarvanja in osušitve beljave, smrtnost (Krokene in Solheim, 1998b; Matusick, 2010). Merjenje simptomov se uporablja za ugotavljanje učinka glive na gostiteljsko drevo (Lee, 2006; Rice in sod., 2007; Krokene in Solheim, 1998b). Nekroze so temnejše dvignjeno ali rahlo ugreznjeno

nekrotično tkivo floema, ki obdaja inokulacijsko točko (Matusick, 2010). Modrenje beljave povzroči gliva, ki prodira globoko in je definirano z modro-sivim obarvanjem beljave (Gibbs, 1993; Seifert, 1993). Osušena beljava je ravno tako odziv drevesa na inokulacijo, ki mu sledi sprostitev terpenov in politerpenov (Matusick, 2010; Raffa in Klepzig, 1992).

2.1.5 Vpliv spremembe okolja na ofiostomatoidne glice

Svetovna trgovina z lesom, lesnimi izdelki in rastlinami pomeni zelo veliko tveganje za vnos novih patogenov v novo okolje. Zato je pomembno ofiostomatoidne glice preučiti tudi v smislu njihovega odziva na spremenjena in nova okolja. Ofiostomatoidne glice, ki povzročajo le nenevarno obarvanje beljave, lahko postanejo resni vaskularni patogeni v novih okoljih (Gibbs, 1993; Seifert in sod., 2006). Taki primeri vnosa alohtonih, tujerodnih gliv v nova okolja so v preteklosti povzročila velike ekonomske in ekološke motnje v gozdovih (Kirisits, 2013). Eden izmed najhujših primerov je odmiranje brestov ali holandska brestova bolezen, omenjena zgoraj (2.1.4.2). Morebitno tveganje je veliko, saj gostiteljske rastline v novih okoljih večinoma nimajo obrambnega mehanizma proti vnesenim patogenom, zatorej se lahko pojavi epidemija, če so okoljske razmere ugodne. Poleg tega pa je ravno prenos z vektorji zelo pripraven za hitro razširitev patogena (Seifert in sod., 2006).

Tudi če glice trenutno povzročajo le manjšo škodo, lahko spremembe okolja, ki se napovedujejo (Kajfež – Bogataj, 2009), povzročijo nova tveganja v večjem obsegu ali na večjih območjih (Kamataa in sod., 2002; Kauserud in sod., 2009). Ofiostomatoidne glice v zadnjih letih na navadni smreki povzročajo vse večje poškodbe, prej pa so povzročale hujše težave le na borih (Friedl, 2004).

2.1.6 Pregled ofiostomatoidnih gliv v Sloveniji

Babuder in Pohleven sta v 90. letih prejšnjega stoletja (1993, 1995) preučevala *Trypodendron lineatum* (Oliv.) na smrekovi hlodovini ter vektorje *Platypus cylindrus* Fabr.

in *Xyleborus monographus* Fabr. na hrastovi hlodovini. Med simbiotskimi glivami sta odkrila naslednje ofiostomatoidne glive: *O. piceae*, *Ophiostoma araucariae* (Butin) de Hoog & Scheffer, *O. piliferum* in *Ophiostoma* sp. M. Jurc (2005) je na smrekovih podlubnikih odkrila *Leptographium* sp. Z našo raziskavo smo znanje o ofiostomatoidnih glivah v Slovenciji nadgradili; osredotočili smo se na navadno smreko in uporabili tudi novejše metode določanja.

V Kartah razširjenosti na *Boletus informaticus*, ki je informacijski sistem za beleženje in kartiranje vrst gliv v Sloveniji, so poleg tistih, ki smo jih izolirali in določili med potekom te raziskave, zabeležene naslednje vrste ofiostomatoidnih gliv: *O. novo-ulmi* in *O. ulmi*, nato *Ceratocystis cainii* Olchow. & J. Reid, *Graphium* sp. Corda, *Leptographium procerum* (W. B. Kendr.) M. J. Wingf.

2.2 PODLUBNIKI

Asociacija med glivami in hrošči je znana več kot 170 let. Leta 1836 je Schmidberger opazil asociacijo hroščev z belo snovjo – Hartig jo je kasneje poimenoval ambrozijska gliva – ki jo za prehrano uporabljajo podlubniki (Paracer in Ahmadjian, 2000). Že v 19. stoletju so poškodbe na lesu zaradi žuželk povezovali z diskoloracijo lesa in glivami (Kirisits, 2004).

2.2.1 Prenos z vektorji

Ofiostomatoidne glive in podlubniki (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) živijo v medsebojni povezanosti – simbiozi v širšem pomenu besede. Simbiozo bi na tem mestu opisali kot skupno življenje organizmov različnih vrst, ki obsega parazitsko, komenzalsko in mutualistično razmerje med organizmi (Martin, 1992; Jurc, 1997; Paracer in Ahmadjian, 2000). Parazitizem je odnos, kjer osebek ene vrste (parazit) živi na ali v telesu druge vrste (gostitelja) in se hrani z njegovimi tkivi oz. deli organov (Tarman, 1992); en osebek ima korist na račun drugega (Paracer in Ahmadjian, 2000). Komenzalizem je nasprotno

povezava organizmov dveh vrst, v katerem ima en udeleženec (komenzial) korist, drugi pa zaradi tega ni oškodovan (Tarman, 1992; Paracer in Ahmadjian, 2000). Mutualizem pa je obvezna povezava osebkov dveh ali več vrst, ki je koristna za vse udeležence (Beaver, 1989; Tarman, 1992), torej povečuje zmožnost preživetja vseh partnerjev (Jurc, 1997). Obseg koristi partnerjev se lahko spreminja in ga je vsekakor zelo težko oceniti (Paracer in Ahmadjian, 2000). Podlubniki so ekonomsko zelo pomembni škodljivci, ki lahko povzročajo ogromno škodo v gozdovih. Najpogosteje so denrobionti in kolonizirajo iglavce (Harrington, 1993). Razlikujemo med floemofagnimi in ksilomicetofagnimi vrstami oz. ambrozijskimi hrošči; prvi kolonizirajo floem in kambij, drugi pa prodirajo v les in se prehranjujejo z glivami, ki preraščajo njihove rovne sisteme; to so t. i. ambrozijske glive (Jurc, 2011). Podlubniki lahko svojo možnost koloniziranja dreves povečajo z asociacijami z drugimi mikroorganizmi, predvsem glivami (Benjamin in sod., 2004; Rivera in sod., 2007). Povezani so lahko z različnimi glivami (Six, 2003; Kirisits, 2004; Novotny in Jankovsky, 2005), vendar so največkrat prav z ofiostomatoidnimi (Upadhyay, 1993; Six, 2003).

Podlubniki prenašajo glivne trose v specializiranih strukturah, imenovanih mikangiji ali micetangiji, ali – še pogosteje – prosto na delih svojega telesa (Harrington, 1993; Six, 2003). Mikangiji so strukture na podlubnikovemu telesu in pomenijo prilagoditev podlubnikov na prenos gliv. V ožjem pomenu so mikangiji specializirane strukture na podlubnikovi povrhnjici, ki vsebujejo žleze ali sekrecijske celice ter se uporabljajo za shranjevanje, transport in prenos gliv (Kirisits, 2004; Harrington, 2005). Pojavljajo se lahko na različnih mestih podlubnika: predprsju, sredoprsju, zgornji čeljusti, pokrovkah ali podkolčku (Kirisits, 2004; Six, 2012). Mikangij v širšem pomenu pa so lahko vdolbine in globlje jamice ali šopi dlačic, ki služijo za prenos gliv in nimajo posebnih žlez (Six, 2003, 2012). Vsi podlubniki nimajo mikangijev v ožjem smislu (Harrington, 2005). Glive prenašajo na eksoskeletu ali neprebavljeni v prebavnem traktu (Kirisits, 2004). Ekonomsko najpomembnejši podlubniki na navadni smreki v Sloveniji in Evropi *I. typographus* nimajo mikangijev z žlezami, pač pa glive prenašajo v vrtinah na pronotumu in pokrovkah (Furniss in sod. 1990; Solheim, 1993). Mikangije imajo predvsem ksilomicetofagni hrošči oziroma podlubniki, ki so življensko odvisni od prehranjevanja z glivami in razkrajajočim se lesom (ksilomicetofagni ali abrozijski hrošči). Ti podlubniki

oziroma njihove larve, ki se z glivami prehranjujejo, trose gliv z iztrebki prenesejo na novega gostitelja (Harrington, 1993; Paine in sod., 1997). Številne raziskave v zadnjih letih so potrdile, da je ta odnos mutualističen (Harrington, 2005; Six, 2012). V Evropi imajo mikangije v ožjem pomenu besede naslednji podlubniki: *Gnathotrichus materiarius* Fitch, *Xyleborus dispar* Fab., *Xyleborus germanus* Blandford, *Xyleborus monographus* Fab., *Xyleborus sexeseni* Rats., *Trypodendron domesticum* Linn., *Trypodendron signatus* Fab., *T. lineatum*. Med pravimi floemofagnimi podlubniki pa imajo mikangije *Hylastes ater* Payk., *Hylastes cunicularius* Er., *Hylurgops palliatus* Gyll., *Ips acuminatus* Gyll., *Ips sexdentatus* Boer. (Kirisits, 2004).

Morfološka podobnost ofiostomatoidnih gliv temelji na prilagoditvi prenosa z vektorji – žuželkami (Six, 2003). Spolne reproduktivne strukture, periteciji, imajo dolge vratove, iz katerih bruhajo lepljive množice trosov, ki se z lahkoto prilepijo na podlubnike (Kirisits, 2004; Jankowiak, 2005; Seifert in sod., 2006). Poleg tega imajo tudi nespolni stadiji dolge steljke, konidiofore, ki nosijo lepljive konidije, ki so prav tako primerni za prenos s podlubniki. Tako se glice prenašajo na novega gostitelja med napadom podlubnikov (Paine in sod., 1997). Spolni in nespolni trosi ofiostomatoidnih gliv so kroglasti, ovalni ali valjasti. S svojim lepljivim ovojem se prilepijo na vektorja le na eni točki in se na primernem substratu lažje sprostijo (Six, 2003).

Nekateri avtorji (Harrington, 1993; Paine in sod., 1997; Six, 2003) podpirajo teorijo, da je odnos med glivami in podlubniki mutualističen, torej da je obvezna povezava osebkov dveh ali več vrst, ki je koristna za vse udeležence (Beaver, 1989). Obseg koristi partnerjev se lahko spreminja in ga je vsekakor zelo težko oceniti (Paracer in Ahmadjian, 2000). Verjetno sta stopnja in tip odvisnosti različna za vsakega posameznega podlubnika z asociacijsko glivo (Kirisits, 2004). Odvisnost se giblje od mutualizma in antagonizma do komenzalizma ter od fakultativne do obvezne simbioze (Six, 2012). Glice imajo korist, ker jih podlubniki raznašajo. Reproduktivni organi anamorfa in teleomorfa kažejo prilagoditve na prenos z vektorji (Harrington, 1993). Podlubnikova korist je lahko prehranjevanje z glivami (Six, 2003; Harrington, 2005), saj so glice lahko dober vir hrane za svoje vektorje, ker vsebujejo sterole, vitamine B, dušik in prebavljive ogljikove hidrate (Harrington, 2005). Predvsem ksilomicetofagni podlubniki so odvisni od prehranjevanja z glivami (Six,

2003). Druga korist podlubnikov je, da ofiostomatoidne glive zmanjšujejo vpliv škodljivih asociacijskih gliv podlubnikov. Glive prav tako znižujejo vlažnost debla na raven, ki je primerna za koloniziranje podlubnikov (Lee, 2006). Patogene ofiostomatoidne glive pospešujejo odmiranje dreves, ko razpredajo svoj micelij po gostiteljskem drevesu, izločajo toksine ter vplivajo na vgrajeni in sproženi obrambni mehanizem dreves. Glive in podlubniki s skupnim delovanjem povzročajo hitrejši nastanek simptomov (nekroz, smoljenja, odmiranja) med kolonizacijo (Paine in sod., 1997). Odnos med podlubniki in ofiostomatoidnimi glivami tako lahko poveča poškodbe na drevesih ali celo povzroči sušenje in odmiranje dreves (Six, 2003; Lee, 2006).

2.3 OBJAVE RAZISKAV TE DOKTORSKE DISERTACIJE

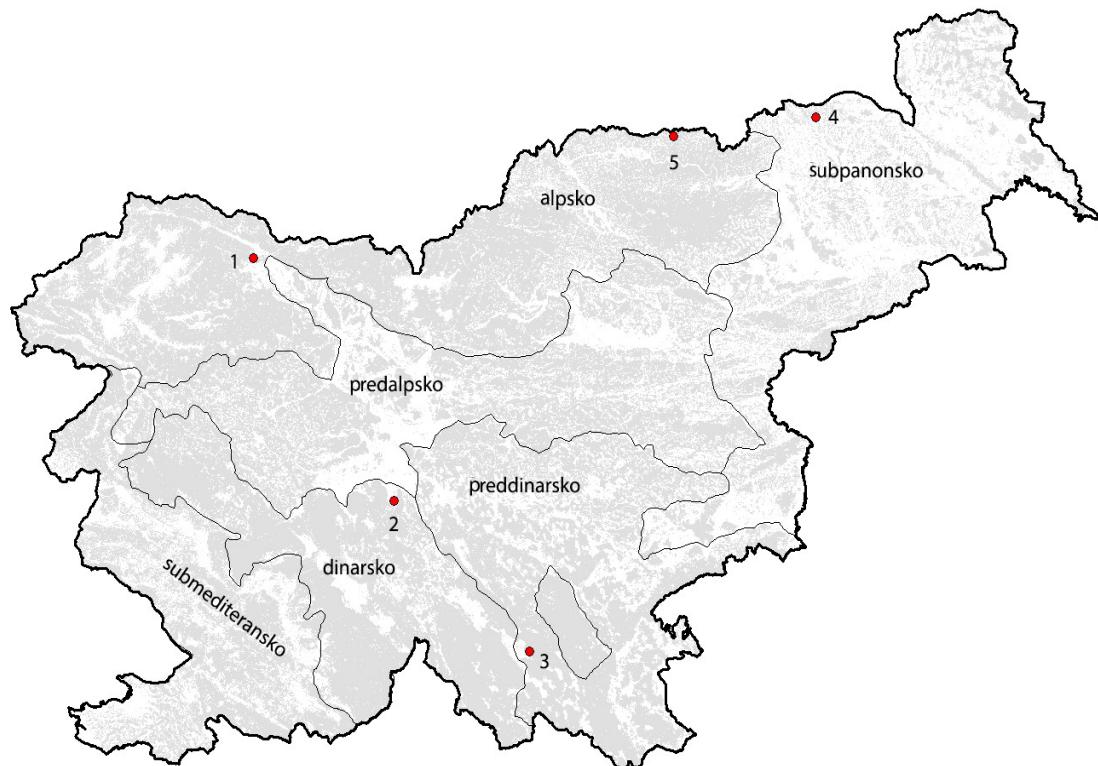
Posamezni deli raziskave te doktorske disertacije so bili zaradi potreb študija in smisla raziskovalnega dela delno ali v celoti objavljeni v znanstvenih člankih in konferencah:

- Repe, A., Borković, D., Jurc, M. 2014. Povezava med podlubniki in glivami modrivrki na iglavcih. Predavanje na 5. seminarju in delavnici iz varstva gozdov, Mašun, 19. 6. 2014.
- Repe, A., Jurc, M. 2009. Ophiostomatoidne gljive na potkornjacima u Sloveniji. V: Glasilo biljne zaštite. 53. seminar biljne zaštite, Opatija, Hrvaška, 9, 1–2: 39–40
- Repe, A., Jurc, M. 2010. Ophiostomatoid fungi (Ascomycota: Ophiostomataceae) associated with bark beetles and their possible economic impact in forests and timber production. Zbornik gozdarstva in lesarstva, 91: 3–12
- Repe, A., Jurc, M. 2012. Glive modrivrke in njihov pomen za gozdarstvo. 3. seminar in delavnica iz varstva gozdov, Štore pri Sežani, 21. 6. 2012.
- Repe, A., Kirisits, T., Piškur, B., Groot, M. de, Kump, B., Jurc, M. 2013. Ophiostomatoid fungi associated with three spruce-infesting bark beetles in Slovenia. Annals of Forest Science, 70, 7: 717–727.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 RAZISKOVALNE PLOSKVE, VZORČENJE IN PRIPRAVA VZORCEV

Terensko delo smo opravili v petih sestojih, kjer je rasla odrasla navadna smreka (*P. abies*), in sicer v štirih različnih fitogeografskih regijah Slovenije (slika 2) (alpsko, dinarsko, preddinarsko, subpanonsko) z različnimi stopnjami poškodb gostiteljskih dreves zaradi podlubnikov. Z izjemo ene lokacije se navadna smreka pojavlja sekundarno na rastiščih listavcev. Sestoji na treh raziskovalnih ploskvah imajo v lesni zalogi več kot 80 odstotkov navadne smreke, na dveh ploskvah je bila smreka primešana listavcem. Sestoji ležijo na nadmorskih višinah od 325 do 1270 m, njihova starost pa je približno 80 let (preglednica 1).



Slika 2: Zemljevid fitogeografskih območij in raziskovalnih lokacij (1 = Boršt, 2 = Ig, 3 = Pugled, 4 = Vučja jama, 5 = Košenjak)

Figure 2: Map of phytogeographic areas and study locations (1 = Boršt, 2 = Ig, 3 = Pugled, 4 = Vučja jama, 5 = Košenjak)

Osebke podlubnikov pod skorjo posekanih gostiteljskih dreves smo zbirali ob rojenju prve generacije podlubnikov v maju, juniju in juliju 2008, 2009 in 2010 na podrtih drevesih navadne smreke, kolonizirane z *I. typographus*, *P. chalcographus* ali *I. amitinus*. Za namen raziskave smo posekali eno ali dve drevesi na vsaki lokaciji.

Preglednica 1: Značilnosti raziskovalnih lokacij, seznam vzorcev in podlubnikov

Table 1: Features of the study areas, list of samples and characteristics of the bark beetles

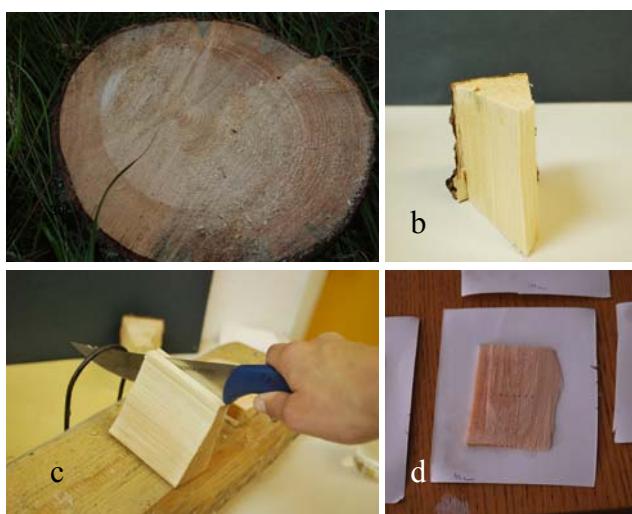
Lokacija	Boršt	Pugled	Ig	Košenjak	Vučja jama
Gostota populacije	gradacija	po gradaciji	latentno	po gradaciji	latentno
Fitogeografska regija	alpsko	preddinarsko	dinarsko	alpsko	subpanonsko
Geografske koordinate	46°24'07" N 14°05'07" E	45°40'43" N 14°51'14" E	45°57'23" N 14°31'05" E	46°38'45" N 15°2'10" E	46°40'19" N 15°44'34" E
Nadmorska višina	850 m	475 m	Ig 325 m	1270 m	370 m
Matična podlaga	apnenec	apnenec	dolomit	silikatne metamorfne kamenine	lapor
Gozdna združba	<i>Luzulo-Fagetum</i>	<i>Omphalodo-Fagetum</i>	<i>Omphalodo-Fagetum</i>	<i>flexuosaef-Piceetum</i>	<i>Querco-Fagetum</i>
% smreke v lesni zalogi	> 80	> 80	15	> 80	3
Povprečna starost dreves	80 let	80 let	80 let	80 let	80 let
Leto vzorčenja	2008	2008, 2009	2008, 2009	2010	2009
Mesec vzorčenja	maj	junij (2008), maj (2009)	julij (2008), maj (2009)	junij in julij	junij
Podlubnik	<i>I. typographus</i> <i>P. chalcographus</i>	<i>I. typographus</i> <i>P. chalcographus</i>	<i>I. typographus</i> <i>P. chalcographus</i>	<i>I. amitinus</i>	<i>I. typographus</i>
Št. osebkov adultov	30	30, 40	30, 40	125	20
Št. vzorcev hodnikov	0	0	0	158	0
Št. vzorcev larv	0	0	0	40	0
Št. vzorcev bub	0	0	0	40	0
Povprečne letne temperature	6–8 °C	8–10 °C	6–8 °C	4–6 °C	8–10 °C
Povprečne letne padavine	1800–2000 mm	1500–1600 mm	1300–1400 mm	1300–1400 mm	1000–1100 mm

Prilagojeno po Repe in sod., 2013.

Pod skorjo posekanih dreves so podlubniki začeli dolbsti materinske hodnike. Podlubnike smo izpod skorje vzeli sterilno, s skalpelom in pinceto. Vsak osebek je bil posebej shranjen

v sterilni epruveti pri temperaturi 4 °C, dokler nismo opravili izolacije gliv. Shranjeni so bili ločeno, s čimer smo zmanjšali možnost medsebojne kontaminacije vzorcev z glivami (Haberkern in sod., 2002). Podlubnike smo določili z determinacijskima ključema Grüne (1979) in Pfeffer (1995).

Zaradi slabega poznavanja asociacijskih gliv podlubnika *I. amitinus* smo na lokaciji Košenjak opravili dodatne raziskave v lesu in različnih življenjskih stadijih hroščev. Iz vsakega drevesa smo izzagali tri kolute na višini 0,5, 6 in 15 metrov. Glive smo izolirali iz rovnih sistemov podlubnikov po postopku, ki sta ga opravila že Solheim (1992a; 1992b) in Kirisits (2009). Kolute smo dan po poseku v laboratoriju cepili vzdolžno. Iz vsakega kolobarja smo vzeli šest krožnih izsekov, skupaj 18. V vsakem odseku smo pod vhodno odprtino podlubnika na 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30 in 35 milimetrih v radialni smeri vzeli vzorec lesa za preučevanje. Skupaj smo torej vzeli 158 vzorcev lesa izpod vhodnih odprtin podlubnika *I. amitinus* (slika 3).



Slika 3: Izolacija gliv iz lesa: a) leseni kolut, b) krožni izsek, c) sterilni odvzem lesa izpod vhodne odprtine na tnatu narejenem za to raziskavo, d) vzorec za izolacijo gliv

Figure 3: Fungi isolation from wood: a) cross section, b) circular section, c) aseptic collected wood from under the beetles entrance hole of the special block made for this study, d) sample for fungi isolation

3.2 IZOLACIJA IN MORFOLOŠKA DOLOČITEV GLIV

Eden izmed načinov določanja gliv temelji na morfoloških znakih in uporabi taksonomskega ključev (Upadhyay, 1981; Solheim, 1986; Grylls in Seifert, 1993; Yamaoka in sod., 1997; Jacobs in Wingfield, 2001; Linnakoski in sod., 2010). Pomembne so značilnosti kolonij, oblika, barva in hitrost rasti. Pri določanju so pomembne lastnosti spolnih (teleomorfi) in nespolnih oblik gliv (anamorfi).

3.2.1 Izolacija gliv

Nabранe osebke podlubnikov smo razpolovili in jih polovico strli na dveodstotnem agarju s sladnim ekstraktom (MEA), polovico pa na sladnem agarju z antibiotikom (CSMA). Gojišče MEA smo uporabili tudi za delce lesa oz. druge razvojne stadije podlubnikov (slika 4).



Slika 4: Vzorci lesa položeni na gojišče MEA

Figure 4: Samples of wood parts placed on MEA medium

V nadaljevanju opisujemo postopek priprave hraničnih podlag za glive.

- Prvo polovico vzorcev smo gojili na agarju s sladnim ekstraktom.

Agar s sladnim ekstraktom (dveodstotni MEA)

15 g	agar (Difco™ Agar Technical; Becton, Dickinson and Company, ZDA)
20 g	sladni ekstrakt (Bacto™, Becton, Dickinson and Company, ZDA)

1000 ml destilirana voda

Sestavine smo raztopili v destilirani vodi. Gojišče smo avtoklavirali 20 minut pri 120 °C in pritisku 1,1 bara. Po Jacobs in Wingfieldu (2001) je gojišče MEA (1–2 %) dovolj učinkovito za rast in sporulacijo večine vrst rodu *Leptographium* spp.

b) Drugo polovico vzorcev smo gojili na sladnem agarju s cikloheksimidom in streptomycinom (CSMA) (Harrington, 1992; Jacobs in Wingfield, 2001).

Sladni agar s cikloheksimidom in streptomycinom (CSMA)

10 g sladni ekstrakt (Bacto™, Becton, Dickinson and Company, ZDA)
10 g agar (Difco™ Agar Technical; Becton, Dickinson and Company, ZDA)
200 mg cikloheksimid (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA)
100 mg streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA)
1000 ml destilirana voda

Ta medij uporabljamo takrat, ko delamo izolacije iz naravnih substratov, zemlje ali žuželk. Tako streptomycin kot cikloheksimid dodamo gojišču po avtoklaviranju gojišč (Harrington, 1992; Jacobs in Wingfield, 2001). Vzorce smo inkubirali v inkubatorjih (Kambič), in sicer v temi pri 20–25 °C. Po razrasti micelija iz hroščev, lesenih delcev oziroma gojišča smo glive precepili na novo gojišče in tako dobili enovrstne vzorce (Yamaoka in sod., 1997).

c) Glive, ki niso proizvajale spolnih struktur, smo za nekaj časa izpostavili UV-svetlobi (z valovno dolžino 254 nanometrov). S tem smo inducirali razvoj spolnih struktur, ki so potrebne za morfološko določitev gliv. Kot dodatno spodbudo za sporulacijo in tvorbo peritecijev smo gojišču dodali koščke lesa iglavcev (slika 5), predvsem navadne smreke velikosti nekaj centimetrov (Harrington, 1992, Jacobs in Wingfield, 2001).

Gojišče z lesenimi koščki (PTM)

Smrekov les brez skorje

15 g agar (Difco™ Agar Technical; Becton, Dickinson and Company, ZDA)
15 g sladni ekstrakt (Bacto™, Becton, Dickinson and Company, ZDA)
1000 ml destilirana voda



Slika 5: Gojišče MEA, obogateno z lesom za dodatno spodbudo sporulacije

Figure 5: MEA medium with spruce twigs to initiate sporulation

Les brez skorje smo vzdolžno razrezali na ena do dva centimetra velike koščke. Koščke smo avtoklavirali 30 minut pri 120 °C in pritisku 1,1 bara (ali alternativno dvakrat po 15 minut v 24-urnem intervalu). Avtoklavirane koščke smo aseptično, z razsekano stranjo navzgor, položili v 60-milimetrsko petrijevko. Avtoklaviran agar s sladnim ekstraktom (1,5-odstotni) smo prelili po lesenih koščkih, da so bili ti povsem prekriti (slika 5).

3.2.2 Morfologija

Za analizo morfoloških struktur gliv smo uporabili mikroskop Olympus BX51 (Olympus Corporation, Japonska), lupo Olympus SZX 12 (Olympus Corporation, Japonska), digitalno kamero Nikon (Nikon Corporation, Japonska) in računalniški program NIS elements 2.30 (Nikon Instech Co. Ltd., Japonska). Vzorce smo opazovali na objektnem steklu v vodi ozziroma smo jih obarvali z barvilom enoodstotnim lakto fenol bombažnim modrilom (Fluka, Buchs, Switzerland). Pri izmeri peritecijev, njihovih vratov, askospor kot tudi konidioforov in konidijev gliv smo naredili vsaj 20 meritev. Pri meritvah smo navajali srednje (S), minimalne (min) in maksimalne (max) vrednosti na način: (min) S (max) ali min – max. Če smo pri tem navajali tako dolžino kot širino, smo vrednosti ločili z ×.

Za identifikacijo gliv smo uporabili morfološke ključe in opise po Upadhyayju (1981), Solheimu (1986), Gryllsu in Seifertu (1993), Yamaoki in sod. (1997), M. Jacobs in Wingfieldu (2001), L. Linnakoski in sod. (2010). Vzorci najbolj reprezentativnih ofiostomatoidnih gliv so deponirani v glivni zbirki v Laboratoriju za varstvo gozdov

(ZLVG) na Gozdarskem inštitutu Slovenije (GIS) v Ljubljani. Dodatno so bili reprezentativni vzorci deponirani v CBS (Fungal Biodiversity Centre) v Utrechtu na Nizozemskem.

3.3 MOLEKULARNE METODE

Kadar preučujemo glive, je pomembno, da za določanje uporabimo zanesljivo in preprosto metodo. Sistematika gliv je zaradi različnih življenjskih oblik in kompleksnih strategij razmnoževanja še vedno nedorečena in zapletena. Določanje samo z morfološkimi znaki ni vedno zanesljivo. Za dodatno potrditev uporabljam molekularne metode, to je določanje glivnih vrst z nukleotidnimi zaporedji izbranih odsekov DNA. Te metode uporabljam tudi za določanje evolucijskih razmerij med taksoni (Martín, 2000).

Za vsako morfološko določeno vrsto smo pripravili skupino vzorcev, torej 13 skupin s sedmimi izolati. Iz teh izolatov smo izbrali reprezentativne, ki smo jih vključili v molekularne analize. Pripravili smo tekoča gojišča s sladom v 60-milimetrskih petrijevkah.

Tekoče gojišče s sladom

20 g sladni ekstrakt (BactoTM, Becton, Dickinson and Company, ZDA)
1000 ml destilirana voda

V sterilnih razmerah smo iz vsake petrijevke z aktivno rastočo glivo na gojišču MEA izrezali košček glivnega micelija in ga prenesli v petrijevko s tekočim gojiščem s sladom. Vzorce smo gojili v inkubatorju, in sicer v temi pri 20–25 °C.

3.3.1 Izolacija genomske DNA

Analizo nukleotidnih zaporedij smo uporabili za nedvoumno potrditev morfološke določitve gliv. Genomsko DNA smo izolirali iz 71 izolatov gliv. DNA smo ekstrahirali z dveodstotnim (wt/vol) pufrom CTAB (cetil trimetil amonijev bromid), tj. metodo za

izolacijo DNA iz rastlinskega tkiva (Rogers in Bendich, 1985; Kump in sod., 1992; Piškur in sod., 2007). Postopek čiščenja z organskim topilom smo ponovili dvakrat z namenom dodatne odstranitve nečistoč.

Postopek ekstrakcije s pufrom CTAB:

1. V mikrocentrifugirki v 700 µl predhodno segretega (68 °C) pufra CTAB smo s pestilom strli približno 10 mg aktivno rastočega micelija, ki smo ga vzeli iz tekočega medija.

Sestavine ekstrakcijskega pufra so:

Dveodstotni pufer CTAB (100 ml)

2 g	CTAB (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA)
10 ml	1M Tris-Cl (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA)
4 ml	0,5M EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA)
28 ml	5M NaCl (Kemika d.d., Zagreb, Hrvaška)
0,2 ml	β-merkaptoetanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA)
57,8 ml	H ₂ O

2. Mikrocentrifugirke smo za eno uro inkubirali v termomešalniku (Thermomixer compact, Eppendorf, Nemčija) pri temperaturi 68 °C.
3. Po inkubaciji smo ekstrakcijski mešanici dodali 700 µl kloroform-izoamilalkohola (1 : 24).
4. Mikrocentrifugirke smo 15 minut pri 13000 vrtljajih na minuto centrifugirali v centrifugi (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Nemčija), in sicer pri temperaturi 4 °C.
5. Supernatat smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in dodali 700 µl kloroform-izoamilalkohola (1 : 24).
6. Mikrocentrifugirko smo ponovno centrifugirali, in sicer 15 minut pri 13000 vrtljajih na minuto in temperaturi 4 °C.
7. Supernatat smo previdno prenesli v novo mikrocentrifugirko, dodali 1/10 volumna 3M natrijevega acetata in 1 volumen izopropanola, ohlajenega na -20 °C.
8. Vzorce smo premešali in jih za vsaj 30 minut shranili v zamrzovalniku pri -20 °C.

9. Precipitacijsko mešanico smo centrifugirali 15 minut pri 13000 vrtljajih na minuto in temperaturi 4 °C.
10. Oborino smo sprali s 70-odstotnim etanolom, ohlajenim na -20 °C, jo osušili, resuspendirali v 30 µl pufra Tris EDTA (TE) in vzorce shranili pri -20 °C.

3.3.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Za PCR lahko uporabimo katerokoli ciljno regijo molekule DNA (Martín, 2000). Pomembno je upoštevati dve stvari: zaporedje mora biti zadostno ohranjeno, tako da oligonukleotidni začetniki pomnožijo ciljni fragment različnih organizmov, in DNA mora vsebovati zadostno variabilnost zaporedja, da lahko gradimo polimorfne vzorce. Največkrat uporabimo del genoma, ki kodira ribosomalno DNA (rDNA). Notranji prepisni vmesnik (ITS, angl. internal transcribed spacer) med visoko ohranjenimi 18S, 5,8S, 28S je dovolj variabilen za določanje zaporedij gliv do vrst (Bruns in sod., 1990; Martín, 2000). Za metodo PCR smo uporabili objavljene začetne oligonukleotide (Linnakoski in sod., 2008). ITS rDNA-regijo (18S rDNA, ITS1, 5'8S rDNA, ITS2, 28S rDNA) smo pomnoževali z uporabo oligonukleotidnih začetnikov ITS1-F (Gardes in Bruns, 1993) ali ITS1 (White in sod., 1990) in ITS4 (White in sod., 1990) (preglednica 2).

Preglednica 2: Oligonukleotidni začetniki uporabljeni v molekularnih analizah raziskave

Table 2: Primers used in the study

Ime začetnika	Zaporedje	Referenca	Proizvajalec
ITS1-F	CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA	Gardes in Bruns, 1993	Applied Biosystems, Cheshire, VB
ITS 4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White in sod., 1990	Applied Biosystems, Cheshire, VB
ITS1	TCCGTAGGTGAAACCTGCGG	White in sod., 1990	Applied Biosystems, Cheshire, VB

Reakcijsko mešanico PCR s končnim volumenom 25 µl smo pripravili v mikrocentrifugirki (1,5 ml). Pripravili smo jo na ledu. Pripravili smo tudi mešanico za negativno kontrolo brez dodane DNA. Vse uporabljene reagente so proizvedli v Promega (Promega Corporation, WI, ZDA).

Reakcijska mešanica PCR

6,85 µl	sdH ₂ O
5 µl	5x reakcijski pufer PCR (Promega, Madison, Wisconsin, ZDA)
2,5 µl	25nM MgCl ₂ (Promega, Madison, Wisconsin, ZDA)
0,5 µl	10 mM dNTP nukleotidi (Promega, Madison, Wisconsin, ZDA)
0,15 µl	Go Taq DNA-polimeraza (Promega, Madison, Wisconsin, ZDA)
2,5 µl	10 µM začetni oligonukleotid ITS1 ali ITS1-F (Omega, Ljubljana, Slovenija)
2,5 µl	10 µM začetni oligonukleotid ITS4 (Omega, Ljubljana, Slovenija)
5 µl	ekstrakt DNA

Reakcijo PCR smo opravili na aparaturi AB Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA). Postopek smo prilagodili po postopku, ki so ga opravili Linnakoski in sod. (2008).

1. Začetna denaturacija: dve minuti pri 95 °C.

2. 40 ciklov:

30 sekund denaturacije pri 95 °C

30 sekund naleganja začetnih nukleotidov pri 54 °C

Podaljševanje verige DNA: ena minuta pri 72 °C.

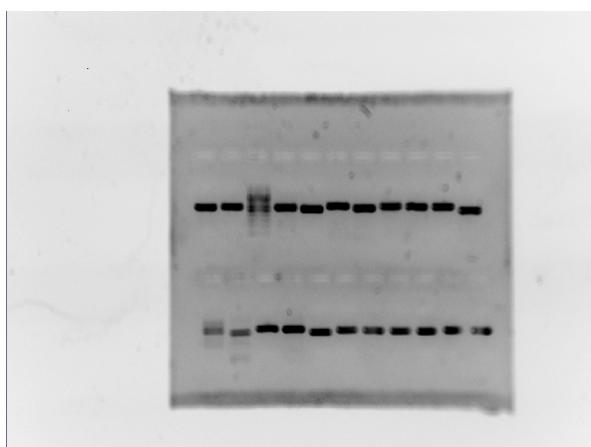
3. Končno podaljševanje osem minut pri 72 °C.

Produkte reakcije smo za nadaljnje analize hranili pri temperaturi –20 °C.

3.3.3 Agarozna elektroforeza

Uspešnost reakcije PCR smo preverili z agarozno elektroforezo. Uporabili smo enoodstotni (w/v) agarozni gel (LE agarosa, Promega) v pufru, ki smo ga za vizualizacijo in analizo pomnožkov obarvali z barvilo SYBR® Safe (Life technologies, New York, ZDA). Elektroforetsko ločevanje je potekalo v horizontalni elektroforetski napravi (Bio-Rad, ZDA) pri stalni napetosti 100 V proti anodi v elektroforetskem pufru 0,5xTBE (Tris-Borat-EDTA). Raztopino agaroze smo nalili na zatisnjeni nosilec in na njem z glavničkom naredili žepke gela. V vzorce smo pred nanašanjem v žepke gela dodali nanašalno barvilo

v razmerju 1 : 4 (GelPilot DNA Loading Dye, Qiagen, Nemčija). V vsak žepek v gelu smo nanesli 5 µl vzorca z barvilom. Za določanje dolžine fragmentov smo v en žepek na gelu na vsak agarozni gel nanesli še vzorec 100 ng markerja DNA (GenRulerTM 1kb DNA Ladder, Fermentas, Litva). Po zaključeni elektroforezi smo gel prenesli v sistem za dokumentiranje Gel DOC XR (Bio-RAD, Kalifornija, ZDA) in rezultate vizualizirali pod svetlogo UV. Dobljene rezultate smo fotografirali in obdelali s programom Quantity One 1-D Analysis Software 4.6.2 (slika 6).



Slika 6: Fragmenti DNA, ločeni z agarozno gelsko elektroforezo (obarvani z barvilom SYBR® Safe) za preverjanje kakovosti produkta PCR

Figure 6: DNA fragments (SYBR® Safe stained) separated by agarose gel electrophoresis for verifying the quality of the PCR product

3.3.4 Čiščenje produktov PCR

Produkte PCR smo očistili manjših delcev DNA in drugih primesi, kot so mineralna olja, začetniki, soli, prosti nukleotidi in proteini. Očistili smo jih s pomočjo kompleta High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Mannheim, Nemčija), po navodilih proizvajalca. V epruveto s PCR-produktom smo dodali sterilno destilirano vodo (sdH₂O) do končnega volumna 100 µl. V prvem krogu smo dodali 500 µl vezalnega pufra v vsako epruveto. Dobro smo premešali, mešanico vložili v High Pure filtrirno epruveto in centrifugirali pri najvišji hitrosti 60 sekund. Odlili smo pretočno tekočino, dodali 500 µl čistilnega pufra in 60 sekund centrifugirali pri 13000 vrtljajih na minuto. Pretočno tekočino smo nato odlili,

dolili 200 µl čistilnega pufra in centrifugirali 60 sekund pri 13000 vrtljajih na minuto. Na koncu smo dodali 100 µl izpiralnega pufra, centrifugirali 60 sekund pri 13000 vrtljajih na minuto in tako dobili očiščen produkt PCR.

3.3.5 Določanje nukleotidnega zaporedja

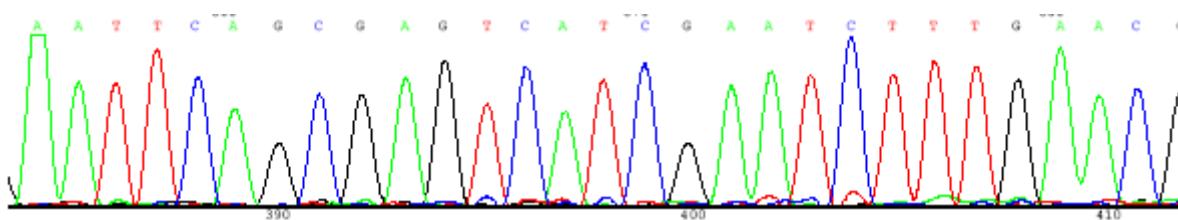
Sekvenciranje DNA je proces določanja zaporedja nukleotidov na odseku DNA (Brown, 2002). Določanje nukleotidnega zaporedja oziroma sekvenciranje smo opravili v komercialni firmi Macrogen (Južna Koreja). Za vsako reakcijo smo pripravili vzorce produkta PCR količine 30 µl s koncentracijo 50 ng/µl v diH₂O (deionizirani vodi). Za sekvenciranje smo uporabili oligonukleotidne začetnike, uporabljeni pri reakciji PCR (preglednica 2) s koncentracijo 10 pmol/µl.

V Macrogenu uporabljajo komplet The BigDye® Direct Cycle Sequencing Kit Terminator Cycling Conditions, s katerim je možno čiščenje produktov PCR oziroma omogoča postopke v cikličnem sekvenciranju, ki poenostavijo protokol in krajsajo čas do končnih rezultatov. Končne produkte prečistijo s precipitacijo oz. obarjanjem z etanolom. Sekvencirajo s sekvencerjem Automatic Sequencer 3730XL (Applied Biosystems/MDS SCIEX, ZDA).

3.3.6 Analiza nukleotidnega zaporedja

Dobljene rezultate smo analizirali. Zaporedja smo pregledali ročno, odprli smo jih s programom Chromas Lite 2.01 (Technelysium Pty Ltd, Avstrija) (slika 7). Naredili smo reverzni komplement zaporedja DNA s funkcijo Reverse + Complement. Zaporedja smo poravnali na spletu s programom MAFFT verzija 6 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>). Vsako tako pridobljeno zaporedje smo shranili v formatu FASTA. Besedilno datoteko smo odprli v programu BioEdit 7.0.0 (Hall, 1999), ki je program za urejanje določanja zaporedij. Nato smo nerazločne nukleotide razjasnili ročno v funkciji Edit, in sicer s primerjavo zaporedij obeh verig. Vsak nejasen nukleotid

smo preverili ročno v programu Chromas Lite 2.01. Preverjeno zaporedje smo ponovno shranili v formatu FASTA. Vsako tako pridobljeno zaporedje smo nato uporabili za posamično nukleotidno iskanje v BLASTn algoritemu na spletni strani NCBI. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) BLAST smo uporabili za iskanje podobnih zaporedij v podatkovni zbirki GenBank in tako smo glive lahko določili z zadostno gotovostjo.



Slika 7: Primer izpisa avtomatskega sekvencerja; pogled na Chromas Lite 2.01. Zaporedje sestavlja serija vrhov, ki predstavljajo nukleotide: adenin (zelen), citozin (moder), gvanin (črn) in timin (rdeč)

Figure 7: Display of automated sequencer (made in Chromas Lite 2.01). The sequence is composed of series of peaks, that represents nucleotides: adenine (green), cytosine (blue), guanine (black), thymine (red)

3.3.7 Filogenetska analiza

Zaporedja smo med seboj poravnali v programu MEGA 5 – Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Tamura in sod., 2011). Postopek je potekal v razdelku programa Align, kjer smo zaporedjem, ki smo jih pridobili med raziskavo, s funkcijo Show Web browser Add to Alignment dodali referenčna zaporedja iz zbirke GenBank, ki smo jih pridobili z iskanjem BLAST. Zaporedja različnih izolatov smo poravnali z uporabo programa Clustal W znotraj programa MEGA 5; parametre smo nastavili na privzeto (uteži za vrzeli: za odpiranje 15, nadaljevanje 6,66). Poravnavo smo ročno pregledali in uredili, prav tako v programu MEGA 5. Smisel poravnave različnih zaporedij je določiti homologne regije med sorodnimi sekvencami (Linnakoski in sod., 2012a; 2012b).

Filogenetske odnose med zaporedji smo določili z metodo združevanja sosedov (NJ, angl. Neighbour-joining Method) (Saitou in Nei, 1987) v programu MEGA 5. Vse parametre smo nastavili na privzeto (1000 bootstrap ponovitev, Maximum Composite Likelihood,

Transitions + Transversions, Uniform rates, Homogeneous pattern between lines, Pairwise deletion). Zanesljivost vsake izmed vej v drevesu smo preverili z neparametrično metodo, ki vključuje metodo vezanja, ki je ponavlajoče se vzorčenje z vračanjem, tj. samo vzorčenje ali angl. *bootstrapping* (Felstein, 1985; Gril, 2009). Vrednost bootstrap nam pove pogostnost pojavljanja posamezne skupine v danem dendrogramu in ponazarja stopnjo zanesljivosti razporeditve posamezne skupine v optimalnem dendrogramu (Gril, 2009). V analizi v programu MEGA smo napravili 1000 bootstrap ponovitev, da smo dosegli zadovoljivo vrednost bootstrap. Če je ta vrednost nižja od 50 odstotkov, ne moremo trditi, ali je nastala skupina naključna ali pa je nastala zaradi dejanske podobnosti med zaporedji. Kadar je ta vrednost višja od 75 odstotkov, pa z veliko verjetnostjo trdimo, da je nastala skupina posledica genetske povezanosti (Gril, 2009; Brown, 2002).

3.4 PATOGENOST GLIV MODRIVK

Najpogostejši način preučevanja patogenosti gliv modrivk je z inokulacijo gliv v gostiteljska drevesa. Inokulacije naredimo v odrasla drevesa (Krokene in Solheim, 1998b; Kirisits, 1998; Sallé in sod., 2005) kot tudi sadike (Krokene in Solheim, 1998a; Jankowiak, 2006a; 2006b). V odrasla drevesa naredimo male kambialne rane, in sicer z luknjačem premera 5 milimetrov. Naredimo lahko posamične inokulacije, s katerimi glivo inokuliramo v posamezne inokulacijske točke (Christiansen in sod., 1999; Baier in sod., 2002; Sallé in sod., 2005), ali množične inokulacije, s katerimi glivo vnesemo v drevo množično, v veliko inokulacijskih točkah (npr. 4 luknje na kvadratni decimeter), s čimer posnemamo napad podlubnikov (Krokene in Solheim 1998b; Krokene in sod., 1999; Kirisits in Offenthaler, 2002). Z majhnimi inkoluiranimi odmerki so drevesa, kljub temu da se velikosti ran razlikujejo, vedno sposobna zadrževati glivno invazijo na določenih nekrozah, ki so rezultat sproženega obrambnega sistema rastlin. Patogenost gliv se običajno meri z merjenjem velikosti teh nekroz (Krokene in Solheim, 1998b; Lee, 2006; Linnakoski, 2011). Z množično inokulacijo z glivami pa je inokulacijsko breme nad pragom vzdržljivosti okuženega drevesa (Krokene in Solheim, 1998b).

V raziskavi smo za raziskovanje patogenosti uporabili 10 različnih vrst gliv (preglednica 3), pridobljenih med raziskavo. Gojili smo jih na gojišču MEA. Glive smo pripravili dva tedna pred inokulacijo in jih hranili pri temperaturi 20–25 °C.

Preglednica 3: Med raziskavo pridobljene glive, ki smo jih uporabili za preučevanje patogenosti.

Table 3: *Fungi species used for pathogenicity testing.*

Vrsta	Izolat	Inokulacija	Št. odraslih dreves	Št. sadik
<i>Ceratocystis polonica</i>	ZLVG348	množična	4	10
<i>Ceratocystis polonica</i>	ZLVG349	množična	4	10
<i>Ophiostoma ainoae</i>	ZLVG340	posamična	1	2
<i>Ophiostoma bicolor</i>	ZLVG358	posamična	1	2
<i>Ophiostoma brunneo-ciliatum</i>	ZLVG342	posamična	1	2
<i>Ophiostoma fuscum</i>	ZLVG352	posamična	1	2
<i>Ophiostoma piceae</i>	ZLVG343	posamična	1	2
<i>Grosmannia cucullata</i>	ZLVG344	posamična	1	2
<i>Grosmannia penicillata</i>	ZLVG346	posamična	1	2
<i>Grosmannia piceiperda</i>	ZLVG345	posamična	1	2
<i>Leptographium</i> sp.-1	ZLVG351	posamična	1	2
			4	10 (MEA), 10 brez
Kontrola	Kontrola			

Preglednica 4: Značilnosti raziskovalne lokacije Litija.

Table 4: *Features of the Litija study area.*

Lokacija	Litija
Gostota populacije podlubnikov	latentno
Fitogeografska regija	predalpsko
Geografske koordinate	46°4'31"N 14°50'20"E
Nadmorska višina	450 m
Matična podlaga	skrilav glinenec
Gozdna združba	<i>Blechno Fagetum typicum</i>
% smreke v lesni zalogi	>80
Povprečna starost dreves	60 let
Socialni status izbranih dreves	2 (dominantna)
Leto inokulacije	2010
Mesec inokulacije	maj
Mesec zaključka inokulacije	oktober
Povprečne letne temperature	8 °C
Povprečne letne padavine	1200 mm

Na raziskovalni ploskvi (preglednica 4) smo izbrali 15 dreves; 12 dreves za množično in 3 drevesa za posamično inokulacijo. Vsa so bila stara okoli 60 let, posajena po požaru v 50. letih prejšnjega stoletja.

Izbrana so bila dominantna drevesa z dobro razvitimi krošnjami, socialni status 2. Določili smo vitalnost dreves. Oceno vitalnosti izbranih dreves smo merili z osutostjo krošnje. Z okularno oceno smo določili odstotek manjkajočih asimilativnih organov. Drevesa smo ocenjevali z najboljše vidne točke, oddaljene vsaj eno drevesno višino (Kovač in sod., 2009).

3.4.1 Množična inokulacija dreves navadne smreke

Drevesa smo inokulirali med 12. in 18. majem 2010 v veliko inokulacijskih točkah. Z izrazom množična inokulacija opisujemo inokulacijo z velikim številom inokulacij na deblu preučevanega drevesa (Christiansen, 1985; Kirisits, 2009). Z množično inokulacijo posnemamo naravni napad podlubnikov z gostoto napada okoli 400 inokulacijskih točk na kvadratni meter. Štiri drevesa smo inokulirali z enim izolatom glive *C. polonica* (ZLVG348), štiri z drugim izolatom glive *C. polonica* (ZLVG349), štiri drevesa pa so bila kontrolna, kar pomeni, da smo jih inokulirali s sterilnim gojiščem MEA. Drevesa smo izmerili, fotografirali in s posebno šablono označili mesta inokulacije. Če so bile na mestih inokuliranja veje, smo jih pustili tam in jih odstranili šele ob inokulaciji, saj sicer drevo že predčasno vključi obrambo. Šablono smo poprej izdelali v laboratoriju. Na trdo plastično polo višine 120 centimetrov smo z luknjačem izdelali luknje velikosti pet milimetrov. Luknje so si sledile v enakomernih razmikih, in sicer štiri luknje na kvadratni decimeter. Drevesa smo množično inokulirali v pasu višine 120 centimetrov, približno 0,6–1,8 metrov nad tlemi med 12. in 18. majem 2010. Drevesa smo inokulirali tako, da smo s posebnim petmilimetrskim luknjačem (za usnje) odstranili skorjo drevesa, v nastalo rano smo sterilno vnesli inokulum in področje spet pokrili s skorjo. Inokulum so bile aktivno rastoče glive (navedeno zgoraj) na dveodstotno gojišče MEA, za kontrolo smo uporabili sterilno gojišče MEA (slika 8).



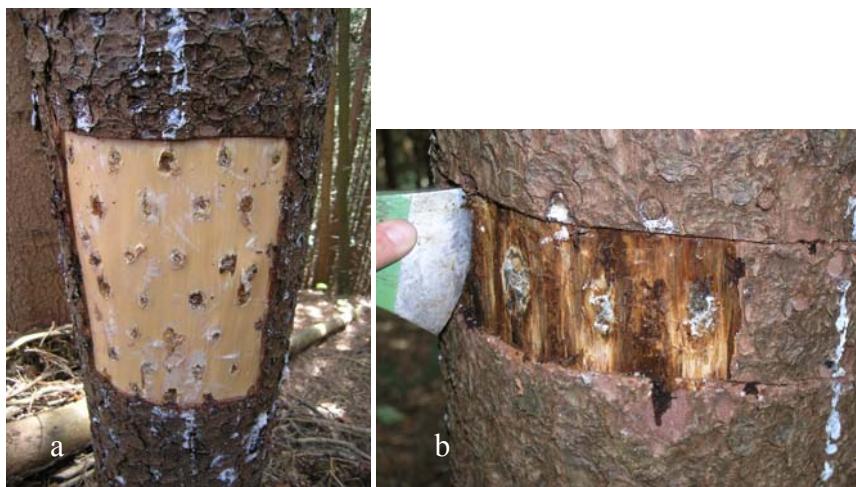
Slika 8: Množična inokulacija odraslih dreves: a) šablona, b) z luknjačem smo odstranili skorjo

Figure 8: Mass inoculation of mature trees: a) template for inoculation, b) removal of bark with cork borer

Čez pet mesecev (7. 10. 2010) smo preverili tok smole iz inokulacijskih točk. Izbrali smo 100 inokulacijskih točk in prešteli tiste (x), iz katerih je iztekala smola, daljša od 3 milimetre in izračunali odstotek ($x/100$ inokulacij). Na sredini inokuliranega območja smo odstranili skorjo v kvadratu 40×40 centimetrov in lise nekroz prorisali na prozorno plastično folijo. Enako smo naredili tudi na zgornjem in spodnjem robu inokulacijskega pasu. Tako smo dobili realno dolžino okužb, saj se v sredini inokulacijskega pasu nekroze združijo (slika 9). Inokulirana drevesa smo posekali in iz okuženih delov izrezali po štiri kolute. Koluti so bili enakomerni, debeli od pol do enega centimetra. Na treh smo obrisali obarvanost, jedrovino in osušeni del ter jih fotografirali z merilom (slika 28). Za reisolacijo gliv smo vzeli četrti kolut, iz katerega smo izrezali klin in izolirali glivo, vzorce iz lesa pa smo dobili s posebnim tnalom (slika 3).

Z reisolacijo glive smo hoteli potrditi Kochove postulate za potrditev vzročne zveze med boleznijo in škodljivim organizmom (Agrios, 1988). Potek Kochovih postulatov:

- glivo smo izolirali iz gostiteljskega drevesa,
- glivo smo gojili v laboratoriju v čisti kulti,
- čisto kulturo smo vnesli v zdrav organizem, kjer je povzročila bolezenska znamenja,
- iz okuženega gostiteljskega drevesa smo ponovno izolirali isto glivo, ki smo jo gojili v čisti kulti.



Slika 9: Inokulacijske točke na deblu navadne smreke z odstranjeno skorjo: a) sredina inokuliranega pasu, b) inokulacije na zgornjem delu inokuliranega pasu

Figure 9: Inoculation points on *P. abies* with bark removed: a) in the middle of inoculation belt, b) inoculations on the upper part of inoculation belt

3.4.2 Posamična inokulacija dreves navadne smreke

Na terenu (preglednica 4) na lokaciji Litija smo izbrali drevesa, jih označili in fotografirali. V laboratoriju smo pripravili inokulum. Na posameznem drevesu smo naredili inokulacije različnih vrst gliv, in sicer na vsako drevo tri različne vrste. V razdalji enega metra, tako da inokulumi niso vplivali drug na drugega, smo vnesli gojišče z aktivno rastočo glivo (13. 5. 2010).



Slika 10: Kontrolni inokulum brez glive

Figure 10: Inoculum without fungi for control

Na obodu drevesa smo naredili inokulacije iste vrste. Na vsakem obodu smo dodali eno inokulacijo za kontrolo, tj. gojišče MEA brez glive (slika 10). Čez štiri mesece (15. 9. 2010) smo odstranili skorjo, premerili velikost poškodbe, fotografirali poškodbe in nekrozo prerasali na prozorno plastično polo.

3.4.3 Inokulacija sadik navadne smreke

Sadike navadne smreke so bile v povprečju visoke 58,2 centimetra in so imele premer 12 milimetrov. V drevesnici Semesadike Mengeš, d. d., smo izbrali 60 štiriletnih sadik navadne smreke, visokih od 42 do 86 centimetrov. Posadili smo jih v lonec premera 17 centimetrov, in sicer v zemljo z mešanico šote in perlita v razmerju 3 : 1. Sadike smo zalivali od spodaj. Bile so postavljene v prostor brez umetne svetlobe in ogrevanja, s povprečnimi dnevno-nočnimi temperaturami 20 ± 2 °C in relativno vlažnostjo 70 ± 10 %. Sadike smo inokulirali z gojiščem (dveodstotni MEA) z aktivno rastočo kulturo glive. Za kontrolo smo 10 sadik inokulirali z gojiščem brez glive, za kontrolo pa smo uporabili tudi 20 netretiranih sadik, ki jih nismo inokulirali. Za inokulacijo smo uporabili enake izolate gliv kot za posamično in množično inokulacijo odraslih dreves. Na deblu smo s sterilnim skalpelom naredili ranice v velikosti 3 x 7 milimetrov (slika 11).



Slika 11: Inokulacije sadik navadne smreke: a) sadike pred prevzemom v drevesnici, b) ranica za inokulacijo z glivo, c) inokulirana sadika

Figure 11: *P. abies* seedling inoculations: a) seedlings in the nursery, b) cut in the trunk for inoculation, c) inoculated seedling

Rano smo ovili s Parafilm® M (Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, ZDA), s čimer smo zmanjšali verjetnost kontaminacije in izsuševanja. Vsak teden – 15 tednov (od 2. 6. 2010 do 12. 9. 2010) – smo preverjali smrtnost. Sadika je bila mrtva, ko so odpadle vse iglice nad inokulacijsko točko. Odmrlim rastlinam smo sproti, vsem drugim pa po 15

tednih, izmerili premer debla in površino nekroze na mestih inokulacije. Steblo smo na inokulacijskem mestu prerezali in izmerili, kako globoko je glede na obarvanost prodrla gliva. Iz lesa okoli okužbe smo s skalpelom vzeli vzorec lesa za reizolacijo glive za potrditev Kochovih postulatov.

3.5 ANALIZA PODATKOV

Frekvenco (%) izoliranih vrst gliv smo izračunali tako, da smo število hroščev, ki so prenašali izbrano vrsto glive, delili s številom vseh istovrstnih hroščev in pomnožili s 100. Razlike v sestavi glivnih vrst med *I. typographus*, *I. amitinus* in *P. chalcographus* kot tudi najdenih gliv v fitogeografskih regijah (samo za *I. typographus* in *P. chalcographus*) smo testirali s permutacijsko multivariantno analizo variance (PerMANOVA) (Anderson, 2001) z uporabo Jaccardovega različnostnega indeksa. Ko smo odkrili statistično značilne razlike, smo parno testirali podlubnike s PerMANOVo z uporabo Holmove korekcije (Holm, 1979, povzeto po Repe in sod., 2013).

Povprečno število ofiostomatoidnih vrst na osebek podlubnika smo izračunali tako, da smo uporabili število vseh izoliranih gliv na vrsto podlubnika in jih delili s številom osebkov posameznih vrst podlubnikov. Nato smo uporabili Kruskal-Wallisov test, s katerim smo preverili, ali je povprečno število ofiostomatoidnih gliv, ki jih nosi posamezen podlubnik, statistično značilno različno glede na vrsto podlubnika. Kjer smo ugotovili statistično značilno različnost, smo nadaljevali s post hoc testom, parno primerjavo vrst podlubnikov pa smo naredili z Games-Howellovim testom.

Za vsako vrsto podlubnika smo izračunali odstotek tistih podlubnikov, iz katerih smo izolirali vsaj eno ofiostomatoidno glivo. Odstotek smo izračunali tako, da smo za vsako vrsto podlubnikov vzeli število osebkov podlubnikov, iz katerih smo izolirali vsaj eno glivo, delili s številom vseh osebkov podlubnikov, razmerje pa pomnožili s 100. Podatke smo analizirali z Ryanovim testom večkratnih primerjav (Ryan, 1960), da smo pokazali, ali obstajajo razlike med tremi vrstami podlubnikov (povzeto po Repe in sod. 2013).

Raziskovali smo povezavo med glivnimi pari. Za izračun povezave smo uporabili koreacijski koeficient Kendall's Tau-b, s katerim se izračuna povezava med dvema merjenima količinama. Rezultati testa so v razponu +1 (vrste se vedno pojavijo skupaj) do -1 (vrste se nikoli ne pojavljajo skupaj). Čim bližje je vrednost koeficiente Kendall's Tau-b (τ_b) ničli, šibkejša je povezava med pari. Bližje je koeficient bodisi do -1 bodisi do +1, močnejša je negativna ali pozitivna korelacija med pojavljanjem glivnih parov skupaj.

Z analizo variance (ANOVA) smo analizirali dolžino in širino posameznih poškodb, odstotek obarvanih in izsušenih območij ter tok smole. Kjer homogenost variance po Levenovem testu ni bila dosežena, smo napravili Kruskal-Wallisov test. Kadar smo ugotovili statistično značilno razliko ($P < 0,05$), smo naredili ali test primerjav najmanj pomembnih razlik (LSD) ali Games-Howellov post hoc test v primerih, kjer je bil uporabljen Kruskal-Wallisov test. V analizi smo uporabili srednje vrednosti. Podatke, podane v odstotkih, smo pred analizo transformirali (arcsin) in tako zagotovili normalno porazdelitev.

Za analizo množičnih in za analizo posamičnih inokulacij smo uporabili analizo glavnih komponent (PCA), to je opisna multivariatna metoda, ki prikaže strukturo in težnjo nabora podatkov. Pred izvedbo PCA-analize se izvede test smiselnosti uporabe analize PCA. Uporabili smo Bartlettov test in Kaiser-Meyer-Olkinovo mero (KMO). Za množično inokulacijo smo analizirali skupno šest značilnosti za izolata glice *C. polonica* in kontrolo. Za posamične inokulacije smo analizirali šest značilnosti za devet ofiostomatoidnih gliv *O. ainoae*, *O. bicolor*, *O. brunneo-ciliatum*, *O. fuscum*, *O. piceae*, *G. cucullata*, *G. penicillata*, *G. piceiperda*, *Leptographium* sp.-1 in kontrolo.

Teste smo napravili s programom SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, ZDA) oz. IBM SPSS Statistics 21 (IBM Corp., Armonk, NY, ZDA). PerMANOVA in analize NMDS so bile opravljene s paketom »vegan« (Oksanen in sod., 2011) v statističnem programu R (R Development Core Team, 2011). Analizo PCA smo opravili v Statgraphics Plus Software verzija 5.0 (Statistical Graphics Corporation, Princeton, NJ, ZDA).

4 REZULTATI

4.1 IZOLACIJA IN DOLOČANJE GLIV

Na petih različnih lokacijah smo nabrali skupno 624 osebkov podlubnikov *P. chalcographus*, *I. typographus* in *I. amitinus* ter 40 bub, 40 larv in 158 vzorcev rovnih sistemov podlubnikov *I. amitinus*. Iz 59,6 % vseh vzorcev pregledanih hroščev smo uspeli izolirati glive, kar predstavlja 454 izolatov različnih ofiostomatoidnih gliv ter 136 izolatov drugih gliv (*Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Acremonium* sp., *Alternaria* sp., *Fusarium* spp.) in kvasovk. Na hroščih *P. chalcographus* so bile glive izolirane v 37,8 % primerih, v 25 % vseh primerov pa so bile zaznane ofiostomatoidne glive. Iz 65,5 % nabranih podlubnikov *I. typographus* in iz 31,5 % teh hroščev so bile izolirane ofiostomatoidne glive. 75,5 % nabranih hroščev *I. amitinus* je imelo različne vrste gliv, 64,2 % *I. amitinus* pa ofiostomatoidne glive. 97,5 % bub je imelo različne vrste gliv in 90 % jih je bilo v asociaciji z ofiostomatoidnimi glivami. 95 % larv je nosilo različne vrste gliv in 62,5 % teh larv je bilo v asociaciji z ofiostomatoidnimi glivami. 51,3 % lesenih delcev je bilo kontaminiranih z različnimi vrstami gliv in 50,6 % lesenih delcev je bilo kontaminiranih z ofiostomatoidnimi glivami.

Določili smo 13 različnih taksonov ofiostomatoidnih gliv:

1. *Ceratocystis polonica*
2. *Ceratocystiopsis minuta* (Siemaszko) H. P. Upadhyay & W. B. Kendr.
3. *Graphium fimbriisporum*
4. *Grosmannia cucullata*
5. *Grosmannia penicillata*
6. *Grosmannia piceiperda*
7. *Leptographium* sp.-1
8. *Ophiostoma ainoae*
9. *Ophiostoma bicolor*
10. *Ophiostoma brunneo-ciliatum* Math.-Käärik
11. *Ophiostoma fuscum* Linnak., Z. W. de Beer & M. J. Wingf

12. *Ophiostoma piceae*

13. *Pesotum* sp.-1

4.1.1 Opis gliv

Določane glive imajo večinoma spolno in nespolno obliko, z eno besedo holomorf. Spolno obliko (teleomorf) smo našli pri vrstah *C. polonica*, *Ceratocystiopsis minuta*, *G. cucullata*, *G. penicillata*, *G. piceiperda*, *O. bicolor* in *O. brunneo-ciliatum*, pri nekaterih pa smo našli le nespolno obliko (anamorf), in sicer pri vrstah *G. fimbriisporum*, *O. ainoae*, *O. fuscum*, *O. piceae*, *Leptographium* sp.-1, *Pesotum* sp.-1. Pri nekaterih glivah so nespolna trosiča zgrajena iz konidioforov, ki lahko stojijo posamično in so preprosti (npr. pri vrstah iz rodu *Ceratocystis*) lahko so posamični in se razlikujejo od vegetativnih hif (npr. pri vrstah rodu *Ophiostoma*, *Grosmannia*) ali pa so konidiofori združeni v sineme in grafije (npr. pri vrstah iz rodu *Pesotum* in *Graphium*).

Meritve morfoloških znakov gliv, pridobljenih v raziskavi, smo primerjali z meritvami referenčnih raziskav. Za vsako strukturo v raziskavi smo opravili vsaj 20 meritev. Navedli smo jih v obliki minimalne in maksimalne vrednosti, in sicer na način: min–max. Dolžine in širine smo ločili z \times . Podatki za velikosti trosov so podani z ovojem, če ni napisano drugače. Kjer v razpredelnici ni podanih meritev, tam določene strukture v kulturi nismo našli oz. je nismo našli v zadostni količini za zagotovitev zadostnega števila merjenj.

Za poimenovanje gliv smo se sklicevali na mednarodno podatkovno bazo o glivah na spletni strani Index Fungorum.

Za vsako skupino gliv navajamo reprezentativni izolat; združili smo jih v preglednico 5. Vsaka gliva ima številko CBS, ki so jo določili, ko smo glive deponirali v zbirku glivnih kultur v Centru za biotsko raznovrstnost gliv (CBS) na Nizozemskem. Sledi številka EMBL, ki je bila določena, ko smo nukleotidno zaporedje deponirali v Evropski laboratorij za molekularno biologijo (EMBL, angl. European Molecular Biology Laboratory). Številko ZVLG smo pridobili, ko smo glive deponirali v Zbirko živih kultur Laboratorija za varstvo gozdov na Gozdarskem inštitutu Slovenije (ZLVG). Z vsako izmed teh oznak

lahko pridobimo podatke o deponirani glivi. Za potrditev gliv smo pridobljena nukleotidna zaporedja gliv primerjali v zbirkki GenBank, in sicer z iskalnikom podobnosti BLAST (orodje za lokalno poravnavanje zaporedij, angl. basic local alignment tool). Ujemajoče zaporedje je predstavljeno s številko zaporedja, ki je najbližji zadetek pri primerjavi nukleotidnih zaporedij z metodo BLAST.

Preglednica 5: Reprezentativni vzorci gliv izoliranih med raziskavo

Table 5: Representative fungi samples isolated during this research

Vrsta	Kraj nabiranja	CBS	EMBL	ZVLG	Ujemajoče zaporedje ¹
<i>Ceratocystis polonica</i>	Pugled	CBS134045	HE866697	ZLVG349	DQ318199
<i>Ceratocystiopsis cf. minuta</i>	Košenjak	CBS134047	/	ZLVG355	/
<i>Graphium fimbriisporum</i>	Pugled	CBS134054	HE866699	ZLVG353	AY148176
<i>Grosmannia cucullata</i>	Ig	CBS134056	HE866693	ZLVG344	AY649784
<i>Grosmannia penicillata</i>	Vučja jama	CBS134055	HE866695	ZVLG347	AM943882
<i>Grosmannia piceiperda</i>	Ig	CBS134057	HE866696	ZLVG345	AM943883
<i>Leptographium</i> sp.-1	Ig	CBS134053	HE866700	ZLVG351	DQ318206
<i>Ophiostoma ainoae</i>	Ig	CBS134051	HE866690	ZLVG341	HM031495
<i>Ophiostoma bicolor</i>	Boršt	CBS134052	HE866691	ZLVG358	HM031505
<i>Ophiostoma brunneociliatum</i>	Košenjak	CBS134050	HE866692	ZLVG357	HM031501
<i>Ophiostoma fuscum</i>	Boršt	CBS134049	HE866698	ZLVG352	GU134161
<i>Ophiostoma piceae</i>	Boršt	CBS134312	HE866694	ZVLG343	JQ289024
<i>Pesotum</i> sp.-1	Boršt	CBS134048	HE866701	ZVLG350	GU134161

Ujemajoče zaporedje¹ je referenčno zaporedje pridobljeno s posamičnim nukleotidnim iskanjem v BLASTn, ki je najbolj ujemajoče z zaporedjem naše raziskave.

***Ceratocystis polonica* (Siemaszko) C. Moreau: Revue Mycol., Paris 17 (Suppl. Colon. No. 1): 22 (1952)** (preglednica: 6; slika 12: a–d)
= *Ophiostoma polonicum* Siemaszko: Planta Pol. 7(3): 33 (1939)

Bazionim: *Ophiostoma polonicum* Siemaszko, 1939.

Klasifikacija: Microascales, Hypocreomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota, Fungi.

Značilnosti kulture: na začetku rasti je zelenkasto siva, kasneje siva do črna, volnata kultura z obilnim zračnim micelijem.

Preglednica 6: Meritve morfoloških značilnosti za vrsto *Ceratocystis polonica*

Table 6: Measurements of morphological characteristic of species *Ceratocystis polonica*

		Meritve (μm)	
		Raziskava	Literatura ^a
Peritecij	Spodnji del	200–300	192–360
	Vrat	600–1100	560–1200 \times 20–42
Askospore		5–7,4 \times 3,5–4,8	4,5–6,0 \times 1,7–2,3
Konidiofor		/	120 \times 4
Konidiji		/	6 \times 4

^a Povzeto po Harrington in Wingfield (1998).

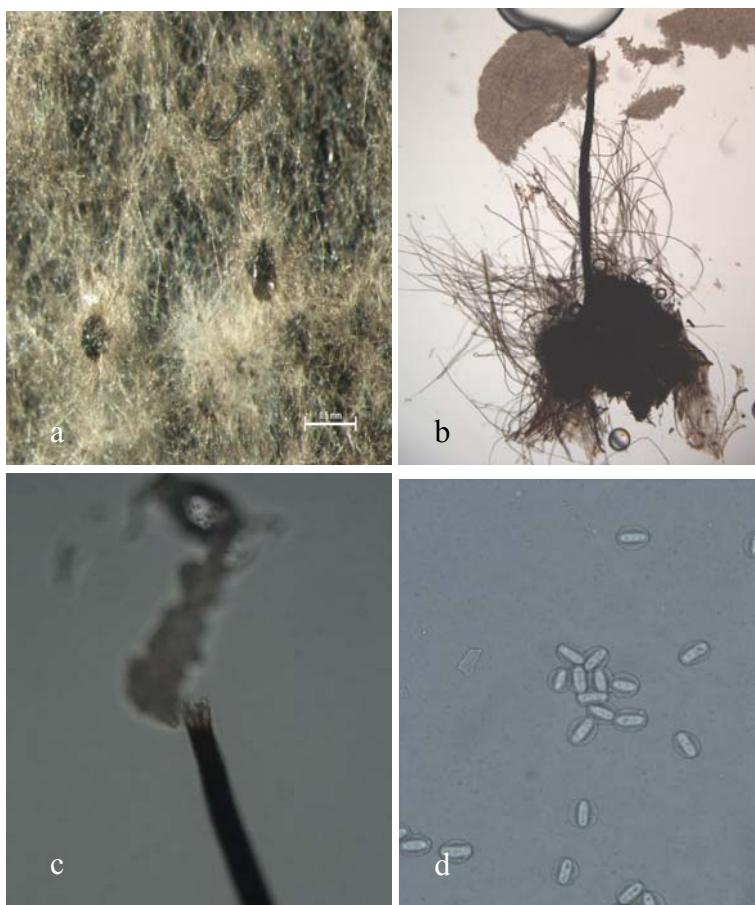
Morfološke značilnosti: temen peritecij, s kroglastim baznim delom in ostiolarnimi hifami. Vratovi so dolgi in se ožijo proti vrhu. Tvorijo askospore z debelim, želatinastim ovojem, ki so od strani videti kot krhlji pomaranče, od zgoraj ovalne in od vrha kroglaste.

Konidiofor: viden redko, posamičen, neseptiran, hialin in se končuje s fialido. Konidiji so hialini, valjasti (Harrington in Wingfield, 1998).

Patogenost glive: zelo patogena gliva, v poizkusih z inokulacijami sposobna tako oslabiti drevo, da se posuši (Horntvedt in sod., 1983; Christiansen, 1985; Solheim, 1988; Kirisits, 1998).

Anamorf: iz rodu *Thielaviopsis* (prej *Chalara*).

Vektor v naši raziskavi: *I. typographus*, *I. amitinus*.



Slika 12: *Ceratocystis polonica*: a) peritecij v kulturi, b) peritecij, c) ostiolar peritecija s hifami, d) askospore
Figure 12: *Ceratocystis polonica*: a) perithecia in culture, b) perithecium, c) ostiolar hyphae, d) ascospores

Ceratocystiopsis cf. minuta (Siemaszko) H.P. Upadhyay & W.B. Kendr.: Mycologia 67(4): 800 (1975) (preglednica: 7; slika 13: a–d)

= *Ophiostoma minutum* Siemaszko: Pl. Polon. 7(3): 23 (1939)

= *Ceratostomella minuta* (Siemaszko) R.W. Davidson: Mycologia 34(6): 655 (1942)

= *Ceratocystis minuta* (Siemaszko) J. Hunt: Lloydia 19(1): 49 (1956)

Sekvenciranje regije ITS rDNA za *Ceratocystiopsis minuta* se ni posrečila v osmih zaporednih poizkusih (glej 4.2), zato smo izolate označili kot *C. cf. minuta* glede na morfološke znake.

Bazionim: *Ophiostoma minutum* Siemaszko, 1939.

Klasifikacija: Ophiostomataceae, Ophiostomatales, Sordariomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota, Fungi.

Značilnosti kulture: hialina do bela.

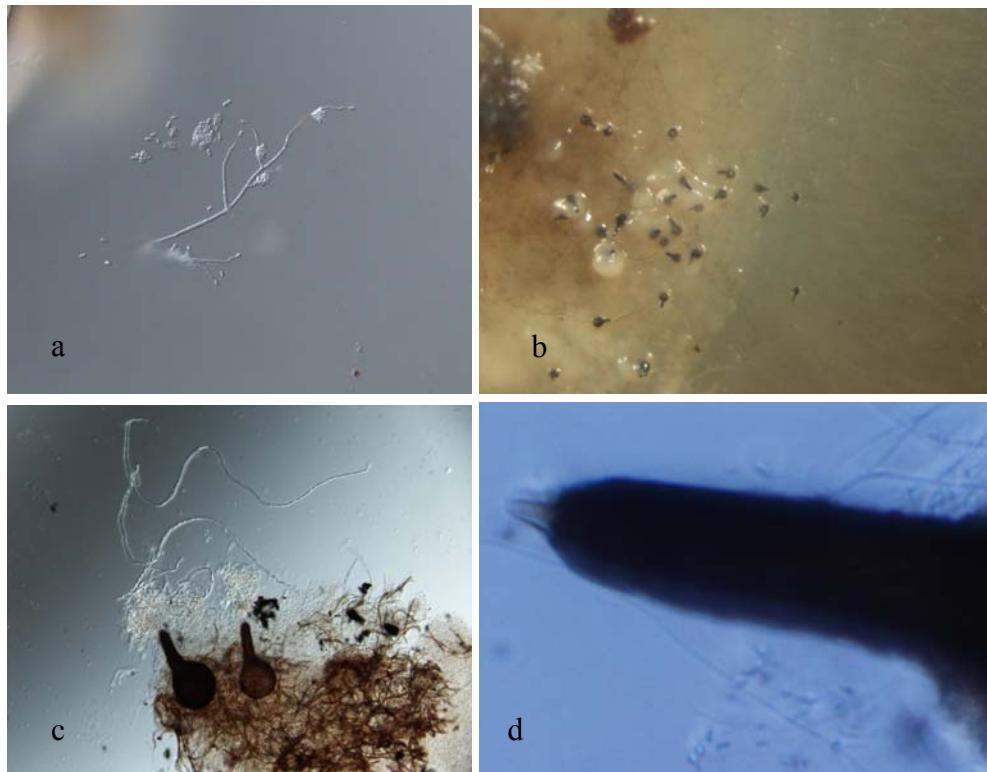
Morfološke značilnosti: periteciji so majhni, temni s konvergentnimi ostiolarnimi hifami. Askospore so hialine v obliki polmeseca. Imajo želatinast ovoj, ki jim daje srpast videz.

Preglednica 7: Meritve morfoloških značilnosti *Ceratocystiopsis cf. minuta*

Table 7: Measurements of morphological characteristics of *Ceratocystiopsis cf. minuta*

	Meritve (μm)		
	Raziskava	Literatura ^a	
Peritecij	Spodnji del	50–100	50–87,5
	Vrat	50–110	45–150 \times 12–21
Askospore		7–10,6	6,5–12 \times 1,2–2
Konidiofor		/	6–22 \times 1–3,5
Konidiji		2–5 \times 1–2	2–5,5 \times 1–1,5

^aPovzeto po Upadhyay (1981).



Slika 13: *Ceratocystiopsis cf. minuta*: a) prost konidiofor s konidiji, b) periteciji v kulturi, c) peritecij z askosporami, d) vrh peritecija s hifami ostiola

Figure 13: *Ceratocystiopsis cf. minuta*: a) simple conidiophore with conidia, b) peritecia in culture, c) peritecium with ascospores, d) perithecioid apex with ostiolar hyphae

Konidiofor: hialin, posamičen. Konidiji hialini, neseptirani (Upadhyay, 1981).

Patogenost glice: ni podatkov.

Anamorf: iz rodu *Hyalorhinocladiella*.

Vektor v naši raziskavi: *I. amitinus*.

***Graphium fimbriisporum* (M. Morelet) K. Jacobs, Kirisits & M.J. Wingf.** (preglednica: 8; slika 14: a, b)

Trenutno ime po Index Fungorum:

Rhexographium fimbriasporum M. Morelet: Ann. Soc. Sci. Nat. Arch. Toulon et du Var 47(2): 91 (1995)

= *Graphium fimbriasporum* (M. Morelet) K. Jacobs, Kirisits & M.J. Wingf. [as '*fimbriisporum*']: Mycologia 95(4): 719 (2003)

Bazionim: *Rhexographium fimbriasporum* M. Morelet, 1995.

Klasifikacija: Microascaceae, Microascales, Hypocreomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota, Fungi.

Značilnosti kulture: bela, v sredini sčasoma postaja rjava.

Morfološke značilnosti: zaznan je bil samo anamorf.

Konidiofor: temna sinemata, z vzporednimi pokončnimi hifami. Konidiji imajo značilne naborke na dnu. Nastajajo v verigah.

Patogenost glice: ni podatkov.

Anamorf: iz rodu *Graphium*.

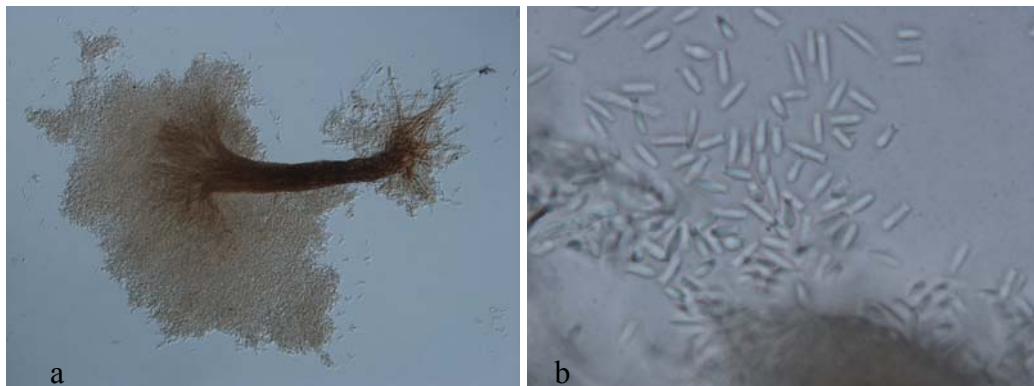
Vektor v naši raziskavi: *I. typographus*, *I. amitinus*.

Preglednica 8: Meritve morfoloških značilnosti *Graphium fimbriisporum*

Table 8: Measurements of morphological characteristics of *Graphium fimbriisporum*

Meritve (μm)		
	Raziskava	Literatura ^a
Konidiofor	150–307	118–230
Konidij	$3,65\text{--}18,2 \times 1,4\text{--}2,5$	$4,4\text{--}12 \times 2$

^a Povzeto po Jacobs in sod. (2003).



Slika 14: *Graphium fimbriisporum*: a) konidiofor – koremij, b) konidiji

Figure 14: *Graphium fimbriisporum* a) conidiophore – coremia, b) conidia

***Grosmannia cucullata* (H. Solheim) Zipfel, Z. W. de Beer & M. J. Wingf., in Zipfel, Beer, Jacobs, Wingfield & Wingfield: Stud. Mycol. 55: 90 (2006)** (preglednica: 9; slika 15: a–d)

= *Ophiostoma cucullatum* H. Solheim: Nordic Jl Bot. 6(2): 202 (1986)

Bazionim: *Ophiostoma cucullatum* H. Solheim, 1986.

Klasifikacija: Ophiostomataceae, Ophiostomatales, Sordariomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota, Fungi.

Značilnosti kulture: prvotno je hialina, kasneje rumenkasta ali z rjavim pridihom.

Preglednica 9: Meritve morfoloških značilnosti *Grosmannia cucullata*

Table 9: Measurements of morphological characteristics of *Grosmannia cucullata*

		Meritve (μm)	
		Raziskava	Literatura ^a
Peritecij	Spodnji del	85–100	76–110
	Vrat	300–500 \times 30	260–560 \times 24–30 oz. 10–20
Askospore		5,1–6,5 \times 2–4,9	5–6 \times 2,8–3,4
Konidiofor		500 \times 20	185–400 \times 12–40
Konidiji		4,1–7,6 \times 1,4–2,6	6–12 \times 1–2

^a Povzeto po Solheim (1986).

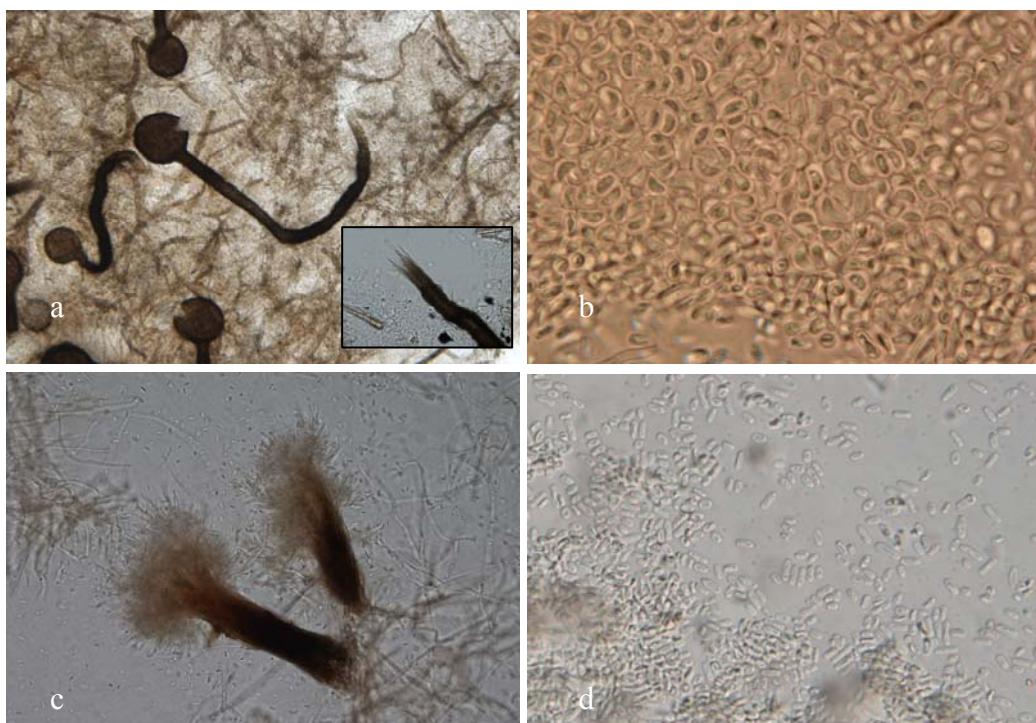
Morfološke značilnosti: temni periteciji s kroplastim spodnjim delom in dolgim vratom, ki se proti vrhu oži. Zaznati je ostiolarne hife, ki so pri dnu rjavkaste, proti vrhu hialine. Askospore so hialine, enocelične, srpaste in imajo debel ovoj.

Konidiofor: pokončen, posamezen, na vrhu razvejen, sinema.

Patogenost gline: ni podatka.

Anamorf: iz rodu *Pesotum*.

Vektor v naši raziskavi: *I. typographus*, *I. amitus*, *P. chalcographus*.



Slika 15: *Grosmannia cucullata*: a) periteciji in vrh peritecija z ostiolarimi hifami, b) askospore, c) koremij, d) konidiji

Figure 15: *Grosmannia cucullata*: a) perithecium and perithecium apex with ostiolar hyphae, b) ascospores, c) coremia, d) conidia

Grosmannia penicillata (Grosmann) Goid.: Boll. R. Staz. Patalog. Veget. Roma, N. S. 16(4): 46 (1936) (preglednica: 10; slika 16: a–d)

Trenutno ime po Index Fungorum:

Ophiostoma penicillatum (Grosmann) Siemaszko: Pl. Polon. 7 (No. 3): 24 (1939)

= *Ceratostomella penicillata* Grosmann: Hedwigia 72: 190 (1932)

= *Grosmannia penicillata* (Grosmann) Goid.: Boll. R. Staz. Patalog. Veget. Roma, N.S. 16(4): 46 (1936)

= *Ceratocystis penicillata* (Grosmann) C. Moreau: Revue Mycol., Paris 17 (Suppl. Colon. No. 1): 22 (1952)

Bazionim: *Ceratostomella penicillata* Grosmann, 1932.

Klasifikacija: Ophiostomataceae, Ophiostomatales, Sordariomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota, Fungi.

Značilnosti kulture: siva.

Morfološke značilnosti: temni, robustni periteciji, ostiolarnih hif ni. Askospore so alantoidne (klobasate), hialine in imajo ovoj.

Konidiofor: pokončen, posamezen, temne barve, na vrhu razvejen. Konidiji so hialini, alantoidni z odsekanim dnom.

Patogenost glice: *G. penicillata* ni tako virulentna kot *C. polonica*, lahko pa povzroči dolge nekroze v floemu navadne smreke in je v velikih količinah sposobna uničiti drevo (Yamaoka in sod. 2000), vendar so ti rezultati v nasprotju s tistimi na Norveškem (Solheim, 1988). Obstaja možnost znotraj vrstne virulence gliv.

Anamorf: iz rodu *Leptographium*.

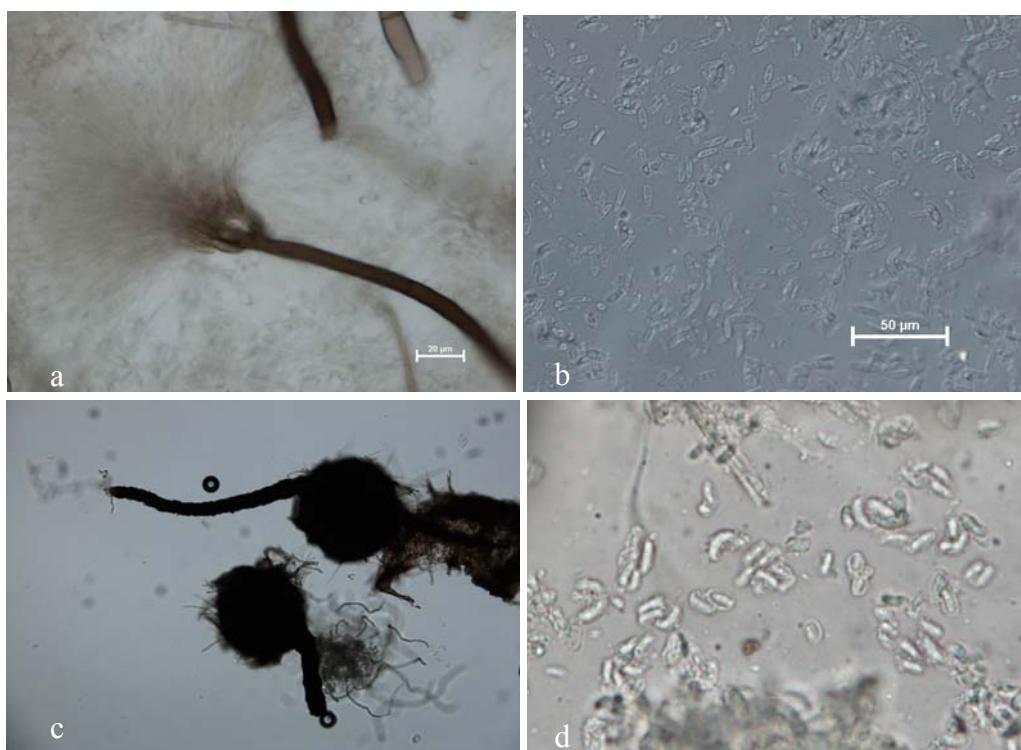
Vektor v naši raziskavi: *I. typographus*, *I. amitinus*

Preglednica 10: Meritve morfoloških značilnosti *Grosmannia penicillata*

Table 10: Measurements of morphological characteristics of *Grosmannia penicillata*

		Meritve (μm)	
		Raziskava	Literatura ^a
Peritecij	Spodnji del	100–200	250–300
	Vrat	200–800 \times 60	300–500 \times 50
Askospore		6 \times 1,8	6 \times 2
Konidiofor		300–500	(130)258–336(460)
Konidiji		10–18,6 \times 2,6–4,5	(4)6–7(10) \times 2–3

^a Povzeto po Jacobs in Wingfield (2001). V oklepajih so navedene skrajne vrednosti.



Slika 16: *Grosmannia penicillata*: a) anamorf *Leptographium*, b) konidiji, c) peritecij, d) askospre

Figure 16: *Grosmannia penicillata*: a) *Leptographium* anamorph, b) conidia, c) peritecia, d) ascospores

***Grosmannia piceiperda* (Rumbold) Goid.: Boll. R. Staz. Patalog. Veget. Roma, N. S. 16: 255 (1936)** (preglednica: 11; slika 17: a–d)

Trenutno ime po Index Fungorum:

Ceratocystis piceiperda (Rumbold) C. Moreau [as 'piceaperda']: Revue Mycol., Paris 17(Suppl. Col. No. 1): 22 (1952)

= *Ceratostomella piceiperda* Rumbold [as 'piceaperda']: Journal of Agricultural Research 52(6): 436 (1936)

= *Grosmannia piceiperda* (Rumbold) Goid. [as 'piceaperda']: Boll. R. Staz. Patalog. Veget. Roma, N. S. 16: 255 (1936)

= *Ophiostoma piceiperdum* (Rumbold) Arx [as 'piceaperdum']: Antonie van Leeuwenhoek 18: 211 (1952)

= *Leptographium piceaperdum* K. Jacobs & M. J. Wingf., in Jacobs, Wingfield & Crous: Mycol. Res. 104(2): 240 (2000)

= *Leptographium piceiperdum* K. Jacobs & M. J. Wingf.: Mycol. Res. 104(2): 240 (2000)

Bazionim: *Ceratostomella piceaperda* Rumbold [as 'piceaperda'], 1936.

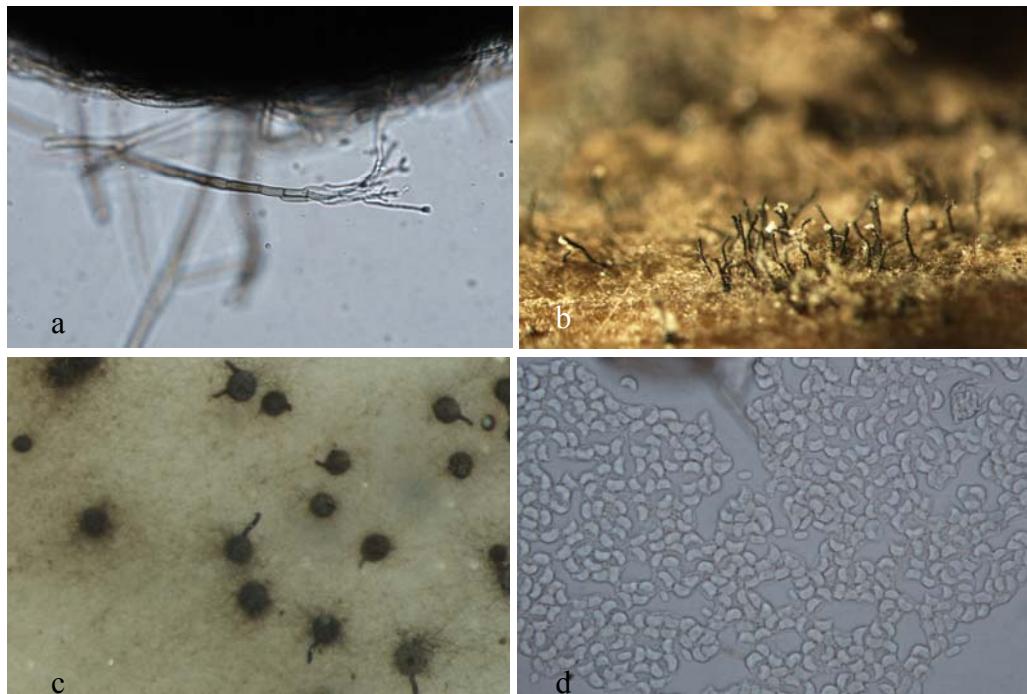
Klasifikacija: Ophiostomataceae, Ophiostomatales, Sordariomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota, Fungi.

Preglednica 11: Meritve morfoloških značilnosti *Grosmannia piceiperda*

Table 11: Measurements of morphological characteristics *Grosmannia piceiperda*

		Meritve (μm)	
	Raziskava	Literatura ^a	
Peritecij	Spodnji del	(350)400–587	(170)199–312(370)
	Vrat	317–350 \times 35	(280)503–603(850) \times (30)32–60 oz. 20–30
Askospore		4,7–7,2 \times 1,7–3,2	(3)4–5(5) \times 2–3
Konidiofor		150–350	(140)200–207(300)
Konidiji		4,4–6,9 \times 2,7–4	(3)4–5(9) \times 1–3

^a Povzeto po Jacobs in Wingfield (2001). V oklepajih so navedene skrajne vrednosti.



Slika 17: *Grosmannia piceiperda*: a) anamorf – *Leptographium* s konidiji, b) periteciji v kulturi, c) periteciji, d) askospore

Figure 17: *Grosmannia piceiperda*: a) anamorph *Leptographium* with conidia, b) perithecia in culture, c) perithecia, d) ascospores

Značilnosti kulture: temna z nekaj zračnega micelija.

Morfološke značilnosti: periteciji so temni, robustni, brez ostiolarnih hif. Askospore klobukaste.

Konidiofor: posamezen, pokončen, temen, na vrhu razvejen. Nastane neposredno iz micelija. V zračnem miceliju so manjši konidiofori. Konidiji so svetlo sivi, ovalni s prisekanim dnom.

Patogenost glice: je variabilna. Sallé in sod. (2005) so jo opisali kot virulentno, sposobno povzročiti velike nekroze. Tudi Kirisits (1998) je dokazal, da vrsta povzroča nekroze z njimi je sposobna obročkati drevo in ga oslabiti.

Anamorf: iz rodu *Leptographium*.

Vektor v naši raziskavi: *I. typographus*, *I. amitinus*, *P. chalcographus*.

***Leptographium* sp.-1** (preglednica 12; slika 18: a–c)

Značilnosti kulture: kolonije so temne z obilo zračnega micelija. Konidiofori rastejo neposredno iz micelija, večinoma iz zračnega micelija.

Morfološke značilnosti: teleomorfa nismo našli.

Preglednica 12: Meritve morfoloških značilnosti za *Leptographium* sp.-1

Table 12: Measurements of morphological characteristics of *Leptographium* sp.-1

Meritve (μm)		
Raziskava	Literatura ^a	
Konidiogen aparat	(22)37–55(75)	/
Prve veje kon. aparata	(8)9–22(25) \times (3)4–6(8)	/
Sekundarne veje	(7)8–16(17) \times 2–5	/
Terciarne veje	(7)8–13(15) \times 2–5	/
Pecelj konidiofora	(170)280–543(515) \times 4–11	/
Konidiofor	(230)310–357(582)	/
Konidiji	3,3–5,5 \times 1,4–2,9	/

^a Glede na dosegljive vire vrsta omenjenega rodu ni opisana v literaturi, saj gre po vsej verjetnosti za neopisano vrsto. V oklepajih so navedene skrajne vrednosti.

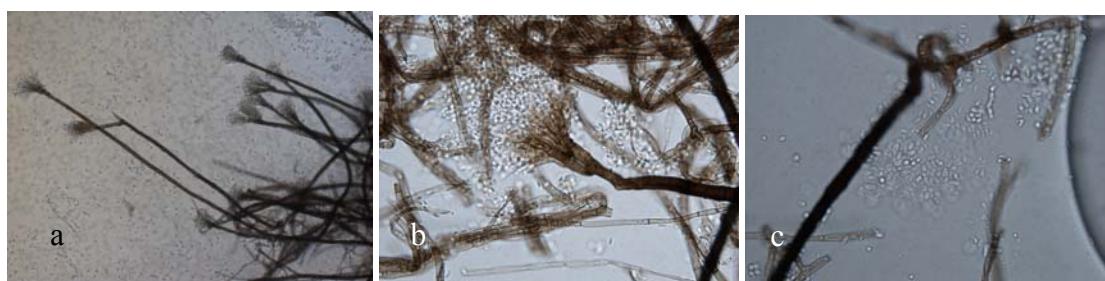
Konidiofor: pokončen, posamičen, ni rizoidnih struktur, peclji temno rjavi, ovalni, septirani (do 17 sept), zožuje se do prvih vej konidiogenega aparata. Apikalne in bazalne celice niso odebujene. Konidiogen aparat ima več serij konidijskih vej. Primarnih vej je 2– do 3, so temno rjave, ovalne, in so 0–1 septirane. Sekundarne veje so temno rjave, neseptirane, občasno se kažejo terciarne veje. Konidiogene celice so posamične, 2–3 na vejo, ovalne, proti vrhu se rahlo zožujejo, dolge (8)9–17(20) µm.

Konidiji: hialini, neseptirani, jajčasti.

Patogenost gline: ni podatkov.

Anamorf: iz rodu *Leptographium*.

Vektor v naši raziskavi: *I. typographus*, *P. chalcographus*.



Slika 18: *Leptographium* sp.-1: a) *Leptographium* oblika anamorfa, b) vrh konidiofora, c) konidiji

Figure 18: *Leptographium* sp.-1: a) *Leptographium* state anamorph, b) apex of conidiophore, c) conidia

Ophiostoma ainoae H. Solheim: Nordic Jl Bot. 6(2): 201 (1986) (preglednica: 13; slika 19: a–d)

Klasifikacija: Ophiostomataceae, Ophiostomatales, Sordariomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota, Fungi.

Značilnosti kulture: sprva je hialina, kasneje potemni.

Morfološke značilnosti: peritecij s spiralno zvitimi ostiolarnimi hifami (zaznan le poredkoma), askospore so cilindrične, hialine Solheim (1986).

Konidiofor: sinema, na vrhu se razveji, rjave barve, na vrhu prozoren. Konidiji prozorni, enocelični. Obstajajo še posamični konidiofori, hialini.

Patogenost gline: ni podatkov.

Anamorf: iz rodov *Pesotum*, *Hyalorhinocladiella*.

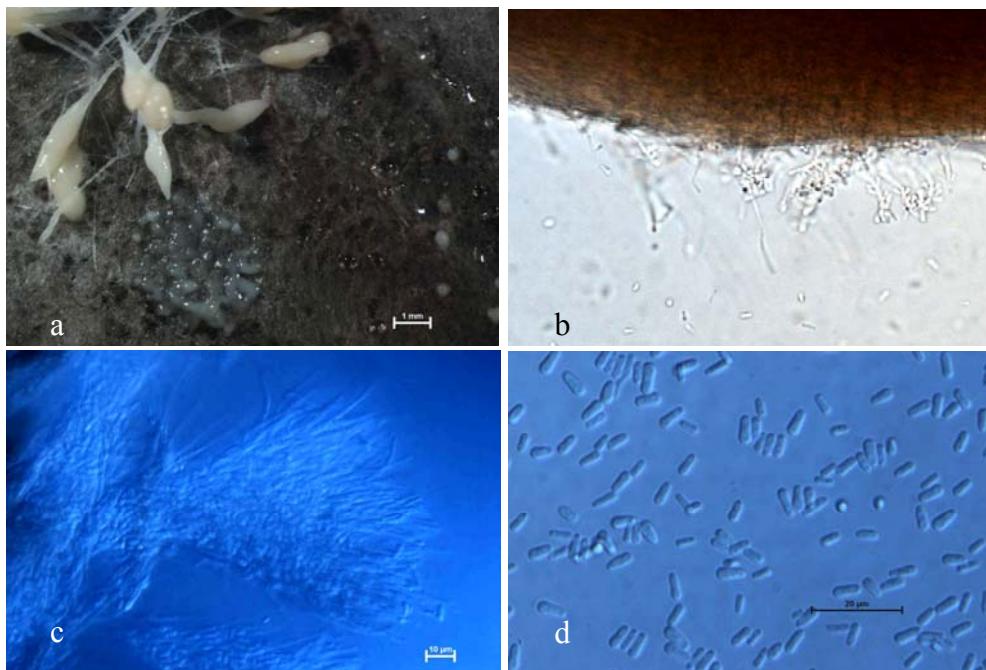
Vektor v naši raziskavi: *I. typographus*, *P. chalcographus*.

Preglednica 13: Meritve morfoloških značilnosti za *Ophiostoma ainoae*

Table 13: Measurements of morphological characteristics of *Ophiostoma ainoae*

Peritecij	Spodnji del	Meritve (μm)	
		Raziskava	Literatura ^a
	Vrat	90–140	90–140
Askospore		$4,3\text{--}7,6 \times 1,3\text{--}2,3$	$3,2\text{--}3,7 \times 0,8\text{--}1,2$
Konidiofor		400–1300(2000)	/
Konidiji		$4,4\text{--}7,9 \times 1,5\text{--}2,2$	$2,5\text{--}9,0 \times 1,7\text{--}3,2$

^aPovzeto po Solheim (1986).



Slika 19: *Ophiostoma ainoae*: a) koremiji v kulturi, b) *Hyalorhinocladiella* anamorf, c) *Pesotum* anamorf, d) konidiji

Figure 19: *Ophiostoma ainoae*: a) coremia in culture, b) *Hyalorhinocladiella* anamorph, c) *Pesotum* anamorph, d) conidia

***Ophiostoma bicolor* R. W. Davidson & D. E. Wells, in Davidson: Mycologia 47(1): 63 (1955)** (preglednica: 14; slika 20: a–c)

= *Ceratocystis bicolor* (R. W. Davidson & D. E. Wells) R.W. Davidson: Mycologia 50(5): 665 (1959)

Klasifikacija: Ophiostomataceae, Ophiostomatales, Sordariomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota, Fungi.

Značilnosti kulture: hialina, s časom lahko spremeni barvo v rjavosivo.

Morfološke značilnosti: periteciji imajo hialin oziroma rjavkasto oranžen spodnji del ter svetlo ali temno rjav vrat. Askospore so hialine, enocelične, ovalne in imajo značilne pravokotne želatinaste ovoje.

Preglednica 14: Meritve morfoloških značilnosti za *Ophiostoma bicolor*

Table 14: Measurements of morphological characteristics of *Ophiostoma bicolor*

		Meritve (μm)	
	Raziskava	Literatura ^a	
Peritecij	Spodnji del	234–300	175–350(365)
	Vrat	(300)600–1000	500–1200(1400) \times 27–78(100) oz. 15–42
Askospore		2,4–5,7 \times 1,1–2,7	3,5–7 \times 2,5–3,5
Konidiofor		/	/
Konidiji		4–6 \times 1,4–2,3	(2)2,5–9,5(12) \times (1)1,5–4,5(5,5)

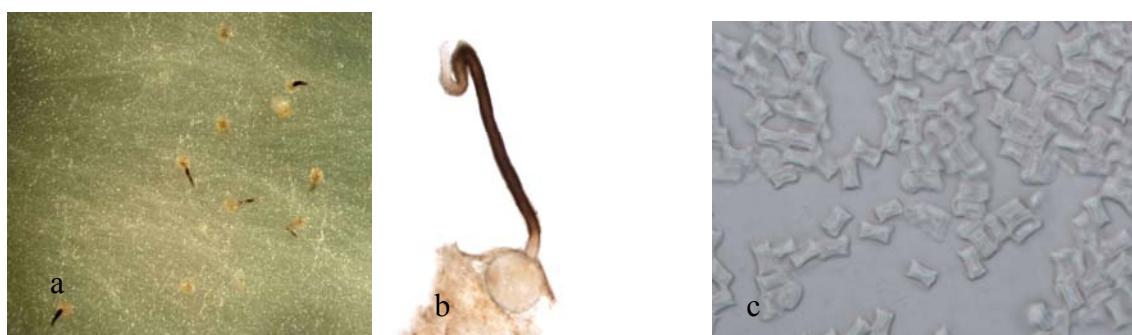
^a Povzeto po Upadhyay (1981).

Konidiofor: pokončen, posamičen, ni pogost (Upadhyay, 1981).

Patogenost glice: lahko povzroči večje nekroze (Solheim, 1988; Kirisits, 1998), vendar ne prodre globoko v beljavo (Solheim, 1988).

Anamorf: iz rodov *Sporothrix*.

Vektor v naši raziskavi: *I. typographus*, *I. amitinus*, *P. chalcographus*.



Slika 20: *Ophiostoma bicolor*: a) periteciji v kulturi, b) peritecij, c) askospore

Figure 20: *Ophiostoma bicolor*: a) perithecia in culture, b) perithecium, c) ascospores

***Ophiostoma brunneo-ciliatum* Math.-Käärik: Meddn SkogsforstnInst. Stockh. 43(4): 44 (1954)** (preglednica: 15; slika 21: a, b)

Trenutno ime po Index Fungorum:

Ophiostoma brunneociliatum Math.-Käärik: Meddn SkogsforstnInst. Stockh. 43(4): 44 (1954)

= *Ceratocystis brunneociliata* (Math.-Käärik) J. Hunt: Lloydia 19: 32 (1956)

Klasifikacija: Ophiostomataceae, Ophiostomatales, Sordariomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota, Fungi.

Značilnosti kulture: hialina, sčasoma postane temna.

Preglednica 15: Meritve morfoloških značilnosti za *Ophiostoma brunneo-ciliatum*

Table 15: Measurements of morphological characteristics of *Ophiostoma brunneo-ciliatum*

Meritve (μm)		
	Raziskava	Literatura ^a
Peritecij	Spodnji del	(100)251,6 (150)200–350(380)
	Vrat	616,09 (550)590–1250(1700) \times 30–45(57,7)
	Askospore	3,5–5 \times 1–2,8 3,5–5 \times 1,5–2,5(3)
	Konidiofor	500–2000 100–3600(4000) \times 15–70
	Konidiji	3–7(9) \times 1–3 (2,5)3–6,5(8,5) \times 1–2(2,5)

^a Povzeto po Upadhyay (1981). V oklepajih so navedene skrajne vrednosti.

Morfološke značilnosti: periteciji so temni, s spiralastimi ostiolarnimi hifami. Vratovi dolgi, temni, ožijo se proti vrhu. Askospore so podolgovate, z želatinastim ovojem.

Konidiofor: posamezen, sinema. Temni, rjavi ali črni pri dnu, proti vrhu prehajajo v svetlo, hialino. Razvejeni so v 2–4 serijah. Konidiji so enocelični, hialini, ovalni.

Anamorf: iz rodu *Pesotum*.

Vektor v naši raziskavi: *I. amitinus*.



Slika 21: *Ophiostoma brunneo-ciliatum*: a) peritecij, b) ostiol peritecija s hifami

Figure 21: *Ophiostoma brunneo-ciliatum*: a) perithecioid, b) ostiolar hyphae

***Ophiostoma fuscum* Linnak., Z. W. de Beer & M. J. Wingf.: Persoonia 25: 85 (2010)**
(preglednica: 16; slika 22: a–c)

Klasifikacija: Ophiostomataceae, Ophiostomatales, Sordariomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota, Fungi.

Značilnosti kulture: kulture so enakomerno rjave.

Morfološke značilnosti: našli smo le anamorf, enako kot Linnakoski in sod. (2010).

Preglednica 16: Meritve morfoloških značilnosti za *Ophiostoma fuscum*

Table 16: Measurements of morphological characteristics of *Ophiostoma fuscum*

Meritve (μm)		
Raziskava	Literatura ^a	
Konidiofor	341–411 \times 241–305	(240)284–539(954) \times (26)30–66(109)
Konidij	4,5–7,3 \times 1,5–2,6	(4)5 – 6(7) \times 1–1,5

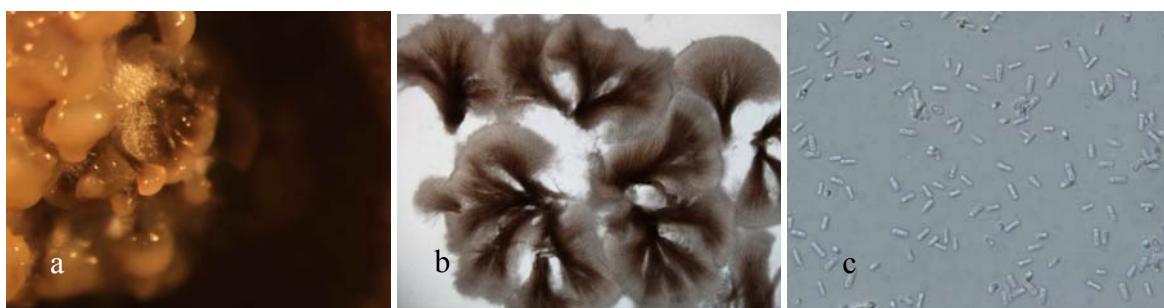
^a Povzeto po Linnakoski in sod. (2010).

Konidiofor: pokončen, posamezen in sinema. Pri *Hyalorhinocladiella* so konidiji hialini, gladki, ovalni. Pri *Pesotum* so konidofori pokončni, ločeni, sestavljeni v šop, temno rjavi. Konidiji hialini, enocelični, podolgovati.

Patogenost glive: ni podatkov.

Anamorf: iz rodov *Hyalorhinocladiella*, *Pesotum*.

Vektor v naši raziskavi: *I. amitinus*, *P. chalcographus*.



Slika 22: *Ophiostoma fuscum*: a) Pesotum oblika v kulturi, b) Pesotum anamorf – koremiji, c) konidiji

Figure 22: *Ophiostoma fuscum*: a) Pesotum state in culture, b) Pesotum anamorph – coremia, c) conidia

***Ophiostoma piceae* (Münch) Syd. & P. Syd.: Annls mycol. 17(1): 43 (1919)**
(preglednica: 17; slika 23: a–b)

- = *Ceratostomella piceae* Münch: Naturwiss. Z. Forst-Landw. 5: 547 (1907)
- = *Ceratocystis piceae* (Münch) B. K. Bakshi: Trans. Br. mycol. Soc. 33(1–2): 113 (1950)
- = *Ceratostomella quercus* Georgev. [as 'Querci']: C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris: 759 (1926)
- = *Ophiostoma quercus* (Georgev.) Nannf., in Melin & Nannfeldt: Svensk Skogsvårdsförening Tidskr. 3–4: 408 (1934)
- = *Ceratocystis quercus* (Georgev.) C. Moreau [as 'querci']: Revue Mycol., Paris 17(Suppl. Colon. no. 1): 22 (1952)
- = *Ceratostomella fagi* Loos: Arch. Mikrobiol. 3: 370 (1932)
- = *Ophiostoma fagi* (Loos) Nannf., in Melin & Nannfeldt: Svensk Skogsvårdsförening Tidskr. 3–4: 408 (1934)
- = *Ceratocystis fagi* (Loos) C. Moreau: Revue Mycol., Paris 17(Suppl. Colon. no. 1): 22 (1952)
- = *Graphium roboris* Georgescu, Teodoru & Badea: Anal. Inst. Cerc. Exp. for. 11: 213 (1948)
- = *Pesotum roboris* (Georgescu, Teodoru & Badea) Grobbel., Z.W. de Beer & M.J. Wingf., in Grobbelaar, Aghayeva, Beer, Bloomer, Wingfield & Wingfield: Mycol. Progr. 8(3): 233 (2009)
- = *Ophiostoma roboris* Georgescu & Teodoru, in Georgescu: Anal. Inst. Cerc. Exp. for., Ser. 1 11: 207 (1948)

- = *Ceratocystis roboris* (Georgescu & Teodoru) Potl., in Potlačhuk & Shekunova: Nov. sist. Niz. Rast. 22: 154 (1985)
- = *Ophiostoma valachicum* Georgescu, Teodoru & Badea: Anal. Inst. Cerc. Exp. for., Ser. 1 11: 198 (1948)
- = *Ceratocystis valachica* (Georgescu, Teodoru & Badea) Potl. [as '*valachicum*'], in Potlačhuk & Shekunova: Nov. sist. Niz. Rast. 22: 155 (1985)
- = *Ophiostoma floccosum* Math.-Käärik: Svensk bot. Tidskr. 45: 219 (1951)
- = *Ceratocystis floccosa* (Math.-Käärik) J. Hunt: Lloydia 19: 36 (1956)
- = *Graphium kubanicum* Shcherb.-Parf.: Rakovye i sosudistye bolezni listvennykh porod (Moscow): 51 (1953)
- = *Ophiostoma kubanicum* Shcherb.-Parf.: Rakovye i sosudistye bolezni listvennykh porod (Moscow): 49 (1953)
- = *Pesotum piceae* J.L. Crane & Schokn.: Am. J. Bot., Suppl. 60(4): 348 (1973)
- = *Ceratocystis kubanica* Potl. [as '*kubanicum*'], in Potlačhuk & Shekunova: Nov. sist. Niz. Rast. 22: 153 (1985)

Bazionim: *Ceratostomella piceae* Münch, 1907.

Klasifikacija: Ophiostomataceae, Ophiostomatales, Sordariomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota, Fungi.

Značilnosti kulture: belkasta, sčasoma postane sivkasta. Micelij je na površini in v mediju.

Morfološke značilnosti: koremiji so zelo pogosti, periteciji so redki v kulturi. Baza peritecija je okrogla, črna, vrat dolg črn, proti vrhu rjavkast. Askospore so hialine, neseptirane, v obliki polmeseca, zbirajo se v kaplji medene barve (Upadhyay, 1981).

Konidiofor: koremij, združena skupina konidioforov. Konidiji so hialini, neseptirani, ovalni, kroglasti ali fuziformni.

Patogenost glive: ni zelo virulentna, kar je bilo ugotovljeno na Norveškem (Krokene in Solheim, 1998b), medtem ko je na Poljskem sprožila dolge nekroze na inokuliranih drevesih (Jankowiak in Kolařík, 2010).

Anamorf: iz rodov *Pesotum*, *Sporothrix*.

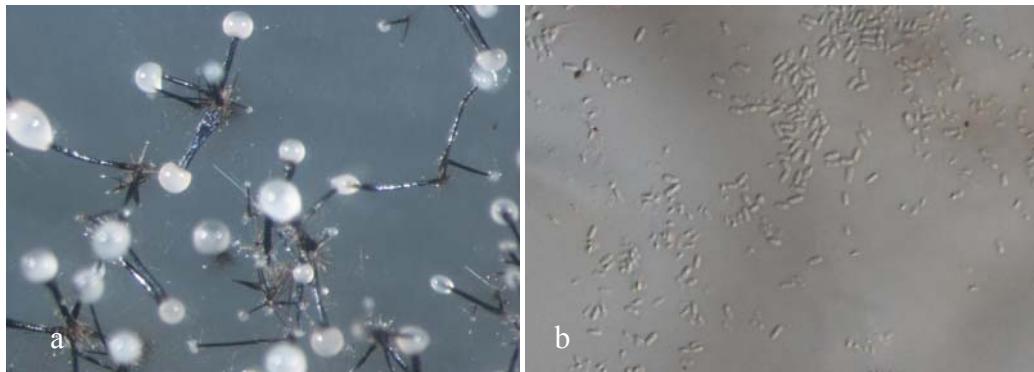
Vektor v naši raziskavi: *I. typographus*, *I. amitinus*, *P. chalcographus*.

Preglednica 17: Meritve morfoloških značilnosti za *Ophiostoma piceae*

Table 17: Measurements of morphological characteristics of *Ophiostoma piceae*

		Meritve (μm)	
		Raziskava	Literatura ^a
Peritecij	Spodnji del	/	77–192
	Vrat	/	500–1500(2900) \times 18–45(52)
Askospore		/	(2)2,5–4,5(5) \times 1,5–2
Konidiofor		187–425	(10)22–115(175) \times 1–2,5(–3,5)
Konidiji		2,9–5 \times 1–1,7	(3)5–15 \times 1–3,5

^a Povzeto po Upadhyay (1981).



Slika 23: *Ophiostoma piceae*: a) nespolna oblika (koremiji) v kulturi, b) konidiji

Figure 23: *Ophiostoma piceae*: a) coremia in culture, b) conidia

Pesotum sp.-1 (preglednica: 18; slika 24: a–d)

Značilnosti kulture: bela sčasoma postane temna.

Morfološke značilnosti: nismo našli teleomorfa.

Preglednica 18: Meritve morfoloških značilnosti za *Pesotum* sp.-1

Table 18: Measurements of morphological characteristics of *Pesotum* sp.-1

		Meritve (μm)	
		Raziskava	Literatura ^a
Konidiofor		100–500(1000)	/
Konidij		/	/

^a Glede na dosegljive vire vrsta omenjenega rodu ni opisana v literaturi, saj po vsej verjetnosti predstavlja neopisano vrsto.

Konidiofor: sinema in mononematous, posamični. Sinema so temne barve, združeni konidiofori.

Patogenost gline: ni podatkov.

Anamorf: iz rodov *Pesotum* in *Sporothrix*.

Vektor v naši raziskavi: *I. typographus*, *P. chalcographus*.



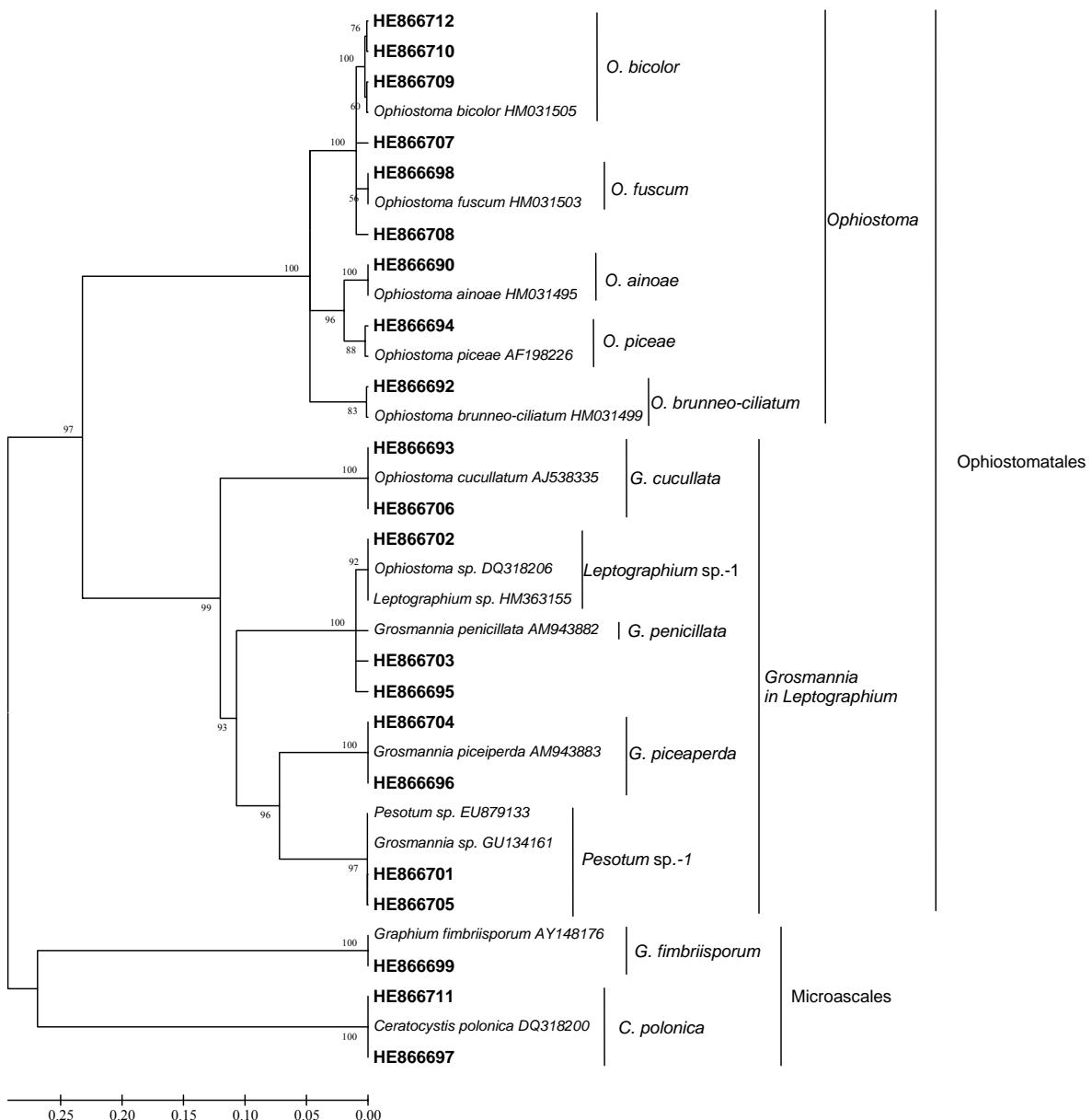
Slika 24: *Pesotum* sp.-1: a) in b) *Pesotum* stadij v kulturi, c) *Sporothrix*, d) konidiji

Figure 24: *Pesotum* sp.-1: a) and b) *Pesotum* state anamorph, c) *Sporothrix* state anamorph, d) conidia

4.2 FILOGENETSKA ANALIZA

Pomnožili smo skupno 71 nukleotidnih zaporedij odseka DNA v genomu gliv, ki zajema regijo 18S rRNA (delno), ITS1, 5,8S rDNA, ITS2 in 28S rRNA (delno) – v nadaljevanju označeno kot ITS rDNA. Za filogenetsko analizo smo jih uporabili 21. V filogenetskem drevesu so predstavljene s pripadajočimi oznakami EMBL, ki smo jih pridobili, ko smo deponirali nukleotidna zaporedja. Pomnoževanje ITS rDNA je dalo fragmente, ki so po

poravnava merili 644 bp (bazni par). V analizo smo vključili 15 referenčnih zaporedij, pridobljenih iz zbirke GenBank (pridobljeni so bili 26. 11. 2010).



Slika 25: Filogram, ki je bil narejen z distančno metodo združevanja najbližnjega soseda (metoda NJ) na podlagi ITS rDNA (18S rRNA (delno), ITS1, 5,8S rDNA, ITS2 in 28S rRNA (delno)). Nova zaporedja, ki smo jih pridobili med raziskavo, so označena **krepko**. Drevo je nekoreninjeno. Odstotek na posameznem klastru ponazarja vrednost metode vezanja (bootstrap) za 1000 ponovitev; prikazane so le tiste, katerih vrednost je višja od 55 %. Na dnu kladograma je merilo, ki ponazarja število nukleotidnih zamenjav (prirejeno po Repe in sod., 2013).

Figure 25: Phylogram obtained using NJ based on the ITS rDNA (18S rRNA (partly), ITS1, 5,8S rDNA, ITS2 in 28S rRNA partly) sequences. Novel sequences obtained during this study are printed in **bold type**. The tree is unrooted. NJ bootstrap support values above 55% are indicated at the nodes (adapted from Repe et al., 2013).

Na podlagi teh zaporedij smo z distančno metodo združevanja najbližjega soseda (metoda NJ) izračunali filogenetsko drevo (slika 25). Filogenetska uvrstitev izolatov, zbranih med raziskavo, kot tudi referenčnih zaporedij, pridobljenih iz zbirke GenBank, se je izkazala kot skladna z drugimi, nedavno opravljenimi evropskimi študijami (Linnakoski in sod., 2008; Jankowiak in Kolařík, 2010, Zipfel in sod., 2006). S filogenetsko analizo smo jasno ločili med vrstami iz reda Microascales in tistimi iz reda Ophiostomatales. Prav tako so bile jasno izražene različne filogenetske skupine znotraj Ophiostomatales. Jasno sta bili ločeni dve monofiletski liniji, in sicer vrste *Grosmannia* z *Leptographium* anamorfom in vrste *Ophiostoma* s *Pesotum*, *Sporothrix* ali *Hyalorhinocladiella* anamorfom. V Microascales pa smo ločili med *Ceratocystis* (teleomorf) in *Graphium* (ki je anamorf).

Razvrščanje gliv na osnovi morfologije je bilo v skladu z razvrščanjem glede na zaporedja ITS rDNA. Določenih je bilo trinajst vrst ofiostomatoidnih gliv. Enajst najdenih vrst ofiostomatoidnih gliv je bilo že znanih, in sicer: *C. polonica*, *Ceratocystiopsis minuta*, *G. cucullata*, *G. penicillata*, *G. piceiperda*, *G. fimbriisporum*, *O. ainoae*, *O. bicolor*, *O. brunneo-ciliatum*, *O. piceae*. Dveh taksonov, *Pesotum* sp.-1 in *Leptographium* sp.-1, ki smo ju našli med raziskavo, nismo mogli nedvoumno določiti, najverjetneje zato, ker gre za doslej neopisani vrsti. Za izolate, ki smo jih poimenovali *Pesotum* sp.-1, smo našli anamorfa *Sporothrix* in *Pesotum*. Vendar nismo našli teleomorfa. Raziskave BLASTn so pokazale največjo podobnost z zaporedjem poimenovanim *Grosmannia* sp. Podobno tudi *Leptographium* sp.-1 oblikuje le anamorf. Ta takson se v filogenetskem drevesu razvršča blizu vrste *G. penicillata*. Sekvenciranje regije ITS rDNA za glivo *Ceratocystiopsis minuta* se ni posrečilo v osmih zaporednih poizkusih. Posledično te vrste nismo vključili v filogenetsko analizo, izolati pa so bili označeni kot *C. cf. minuta* le glede na morfološke znaake.

4.3 GLIVE V ASOCIACIJI Z RAZLIČNIMI PODLUBNIKI

Vse raziskovane vrste podlubnikov so bile v asociaciji z različnimi ofiostomatoidnimi glivami. Deset različnih vrst glivnih taksonov je bilo najdenih v asociaciji z *I. typographus*, osem s *P. chalcographus* in deset z *I. amitinus*. V preglednici 19 je predstavljeno pojavljanje (srednjih vrednosti) ofiostomatoidnih gliv na podlubnika. S Kruskal-Wallisovim testom smo prikazali statistično značilno razliko med srednjimi vrednostmi pojavljanja ofiostomatoidnih gliv na podlubnika ($\chi^2 = 135,2$, $df = 2$, $P < 0,001$). Vir razlik smo poiskali z Games-Howellovim testom. Razlike so se pokazale v parih *I. amitinus* in *I. typographus* kot tudi *I. amitinus* in *P. chalcographus* ($P < 0,001$ za oba para). Razlike med *P. chalcographus* in *I. typographus* niso bile statistično značilne.

Statistično značilno razliko smo našli med vrstami podlubnikov v sestavi gliv ($F = 22,5$; $P < 0,001$; $R^2 = 0,13$). S post hoc testom smo dokazali, da je sestava vrst gliv na podlubnika različna med vsemi tremi pari podlubnikov (*I. typographus* – *P. chalcographus*: $F = 8,1884$; $P < 0,01$; *I. typographus* – *I. amitinus*: $F = 30,967$; $P < 0,01$; *P. chalcographus* – *I. amitinus*: $F = 24,9$; $P < 0,01$). Vsak posamezni podlubnik *I. amitinus* pa ima precej bolj podobno sestavo vrst gliv kot posamezni podlubniki *I. typographus* in *P. chalcographus*.

Z Ryanovim testom proporcev različnih primerjav smo za posamezni glivni takson med vsemi tremi podlubniki dokazali razliko za nekatere glivne taksone (preglednica 19).

Na splošno je bila najpogosteje najdena vrsta *O. bicolor* (17,3 %); pogostejša je bila na podlubnikih *I. typographus* in *I. amitinus* kot pa na podlubniku *P. chalcographus*. Vrsta *O. brunneo-ciliatum* je bila druga najpogosteje najdena gliva, našli pa smo jo le na podlubniku *I. amitinus*. Sledijo naslednje glive: *G. piceiperda*, *O. ainoae*, *Ceratocystiopsis minuta*, *G. penicillata*, *O. piceae*, *G. cucullata*, *C. polonica*, *O. fuscum*, *G. fimbriisporum*, *Leptographium* sp.-1 in *Pesotum* sp.-1. Tudi vrsto *Ceratocystiopsis minuta* smo našli le na podlubniku *I. amitinus*. Vrsta *O. ainoae* je bila najpogosteje najdena v asociaciji s podlubnikom *P. chalcographus*, pogosta je bila tudi v asociaciji s podlubnikom *I. typographus*, nismo pa je našli v asociaciji s podlubnikom *I. amitinus*. Poleg tega smo vrsti *G. piceiperda* in *G. penicillata* pogosteje našli v asociaciji s podlubnikom *I. amitinus*.

kot pa z drugima dvema podlubnikoma. Vrsto *C. polonica* smo našli le pri podlubnikih *I. typographus* in *I. amitinus*, frekvence izolacije pa so bile pri obeh nizke.

Preglednica 19: Ofiostomatoidne glive, ki smo jih med raziskavo izolirali iz podlubnikov *I. typographus*, *P. chalcographus* in *I. amitinus*.

Table 19: Ophiostomatoid fungi isolated from bark beetles *I. typographus*, *P. chalcographus* in *I. amitinus* in this study.

	<i>I. typographus</i>		<i>P. chalcographus</i>		<i>I. amitinus</i>		Sku	
	Št. ²	% ³	Št. ²	% ³	Št. ²	% ³	Št.	%
<i>Ceratocystis polonica</i>	6 ^b	2,6	0 ^a	0,0	10 ^b	4,9	16	2,6
<i>Ceratocystiopsis minuta</i>	0 ^a	0,0	0 ^a	0,0	43 ^b	21,1	43	6,9
<i>Graphium fimbriisporum</i>	4 ^b	1,7	0 ^a	0,0	5a ^b	2,5	9	1,4
<i>Grosmannia cucullata</i>	8 ^a	3,5	3 ^a	1,6	8 ^a	3,9	19	3,0
<i>Grosmannia penicillata</i>	3 ^a	1,3	0 ^a	0,0	38 ^b	18,6	41	6,6
<i>Grosmannia piceaperda</i>	11 ^a	4,7	10 ^a	5,3	27 ^b	13,2	48	7,7
<i>Leptographium</i> sp.-1	3 ^a	1,3	1 ^a	0,5	0 ^a	0	4	0,6
<i>Ophiostoma ainoae</i>	21 ^a	9,1	26 ^a	13,8*	0 ^b	0	47	7,5
<i>Ophiostoma bicolor</i>	56 ^a	24,1*	14 ^b	7,5	38 ^a	18,6	108	17,3*
<i>Ophiostoma brunneo-ciliatum</i>	0 ^a	0,0	0 ^a	0,00	71 ^b	34,8*	71	11,4
<i>Ophiostoma fuscum</i>	0 ^a	0,0	5 ^b	2,7	8 ^b	3,9	13	2,1
<i>Ophiostoma piceae</i>	7 ^a	3,0	4 ^a	2,1	19 ^b	9,3	30	4,8
<i>Pesotum</i> sp.-1	2 ^a	0,9	3 ^a	1,6	0 ^a	0	5	0,8
Št. izolatov	121		66		267		454	
Št. taksonov	10		8		10		13	
Število ofiostomatoidnih gliv/ podlubnika	0,5		0,4		1,3		0,7	
Podlubniki, ki nosijo vsaj eno ofiostomatoidno vrsto (%)	31,5 ^a		25,0 ^a		64,2 ^b		40,0	

¹ Število podlubnikov glede na vrsto

² Število izolatov določene glivnega taksona za vse tri vrste podlubnikov

³ Frekvenca gliv, ki jih podlubnik prenaša (št. gliv/št. hroščev)*100.

Podatke smo analizirali z Ryanovim testom, da smo raziskali razliko med vrstami podlubnikov. Vrednosti, ki jim sledijo različne črke, so bile statistično značilno drugačne pri $P < 0,05$.

Prirejeno po Repe in sod. (2013).

* najpogostejsa gliva

4.4 GLIVE V ASOCIACIJI Z RAZLIČNIMI ŽIVLJENJSKIMI STADIJI PODLUBNIKA IN ROVNIMI SISTEMI RAZISKOVANIH PODLUBNIKOV V LESU

Na Košenjaku nad Dravogradom smo izolirali glive iz imagov, larv, bub in rovnih sistemov podlubnikov v lesu (*I. amitinus*). Ugotovili smo, da glede na tip substrata (imago, larva, buba, les) obstajajo razlike v sestavi in količini gliv. Iz imagov smo izolirali največ različnih taksonov gliv (10). Večina bub je imela v asociaciji ofiostomatoidne glive, najmanjšo raznolikost gliv pa smo ugotovili na vzorcih lesa (preglednica 20).

Preglednica 20: Vrste gliv v asociaciji z *I. amitinus* glede na substrat izolacije.

Table 20: *I. amitinus* associated fungi regarding the isolation substrate.

	Podlubniki		Les		Larve		Bube		Skupaj	
	204 ¹		158 ¹		40 ¹		40 ¹		442 ¹	
	Št. ²	% ³								
<i>Ceratocystis polonica</i>	10	4,9	16	10,1	0	0	0	0	26	5,9
<i>Ceratocystiopsis minuta</i>	43	21,1	6	3,8	10	25	14	35	73	16,5
<i>Graphium fimbriisporum</i>	5	2,5	0	0,0	0	0	0	0	5	1,1
<i>Grosmannia cucullata</i>	8	3,9	0	0,0	0	0	2	5	10	2,3
<i>Grosmannia penicillata</i>	38	18,6	36	22,8	6	15	14	35	94	21,3
<i>Grosmannia piceiperda</i>	27	13,2	4	2,5	6	15	2	5	39	8,8
<i>Ophiostoma bicolor</i>	38	18,6	20	12,7	8	20	8	20	74	16,7
<i>Ophiostoma brunneociliatum</i>	71	34,8	20	12,7	10	25	32	80	133	30,1
<i>Ophiostoma fuscum</i>	9	4,4	2	1,3	6	15	0	0	17	3,8
<i>Ophiostoma piceae</i>	19	9,3	2	1,3	0	0	2	5	23	5,2
Skupaj	268		106		46		74		494	
Št. taksonov ofio. gliv	10		8		6		7		10	
¶ število ofio. gliv na osebek	1,3		0,7		1,2		1,9		1,1	
Vzorci z vsaj eno ofio. glivo (%)	65,2		42,2		63,1		90,0		59,1	
Kvasovke	43	21,1	5	3,2	20	50,0	15	37,5	83	18,8
Penicillium sp.	10	4,9	32	20,3	2	5,0	4	10,0	48	10,9
Skupaj	321		143		68		93		625	

¹ Število vzorcev razvojnih stadijev hroščev in lesa

² Število izolatov posamezne vrste glive

³ Delež gliv na vzorec (št. gliv/št. vzorcev)*100

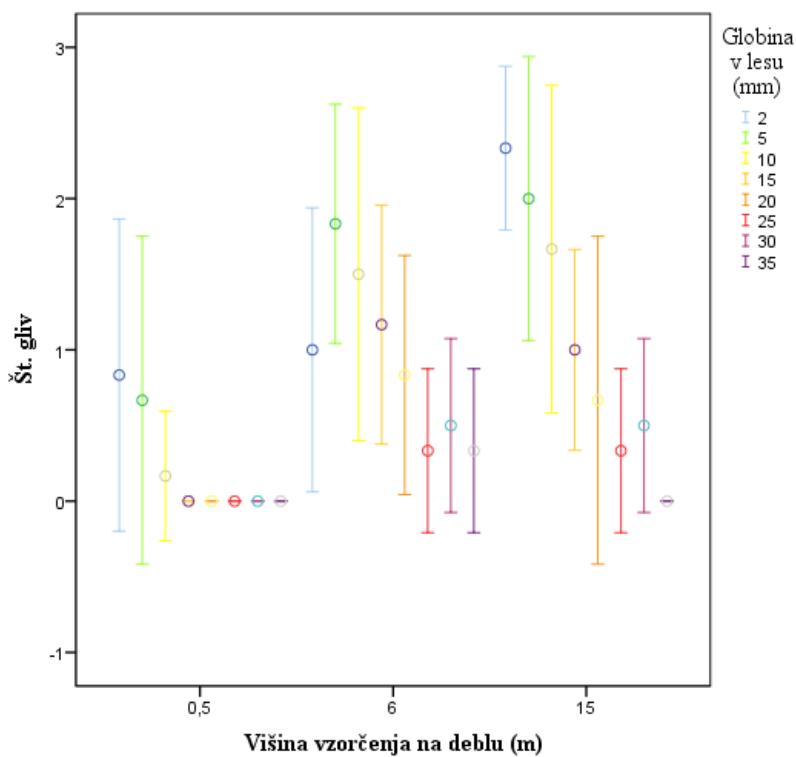


Slika 26: Ofiostomatoidne glice v rovih podlubnikov

Figure 26: Ophiostomatoid fungi in the bark beetle galleries

Med prvim vzorčenjem junija 2010 so podlubniki ravno kolonizirali preiskovani smreki, tako da do obarvanja lesa še ni prišlo. Predvidevamo, da je bilo prisotnih malo gliv. Posledično iz lesa nismo izolirali gliv. Med drugim vzorčenjem julija 2010 smo opazili obarvanost lesa pri smreki (slika 26). Povprečna globina obarvanosti v lesu je bila 19,3 milimetra (slika 27).

Iz lesa smo izolirali devet vrst ofiostomatoidnih gliv, poleg njih še izolate rodu *Penicillium* sp. in različne kvasovke. Gliva *G. penicillata* je bila zabeležena na 44 % kolutov oziroma na 25 % lesnih delcev in je bila tako najpogosteje izolirana vrsta. Sledili sta ji vrsti *O. bicolor* in *O. brunneo-ciliatum*, ki sta bili najdeni na skoraj 14 % vseh delcev lesa. Vrsta *O. brunneo-ciliatum* je bila zabeležena na 77 % vseh kolutov, vrsta *O. bicolor* pa na 56 %. Gliva *C. polonica* se je pojavljala na 33 % vseh kolutov oziroma na 11 % vseh lesenih delcev. Vrsti *C. polonica* in *G. penicillata* sta prodrlji najgloblje v beljavo. Z globino lesa število gliv pada. Na kolutu, ki smo ga odžagali na 0,5 m od panja, smo izolirali le glivi *O. bicolor* in *O. brunneo-ciliatum*, pa še to le v majhnih deležih (slika 27). Na 48,8 % koščkov lesa nismo izolirali gliv



Slika 27: Pojavljanje gliv na različnih globinah v lesu glede na višino debla. Os X ponazarja višine debla od tal (metri), kjer smo vzeli vzorce lesa, os Y pa številčno pojavljanje gliv. Vsak stolpec pove, koliko je bilo gliv v lesu na 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30 in 35 milimetrih.

Figure 27: The presence of fungi at different depths with regard to the height of the trunk. X axis represents trunk heights (m), where the samples were taken; Y axis represents number of isolated fungi. Colons indicate number of isolated fungi at 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 mm.

4.5 GLIVE V RAZLIČNIH FITOGEOGRAFSKIH REGIJAH

Skupno smo izolirali 308 izolatov gliv v alpski regiji, 64 v dinarski, 27 v subpanonski in 55 v preddinarski. V raziskavi asociacijskih gliv v različnih regijah smo vzeli le hrošča *I. typographus* in *P. chalcographus*. Razlik s permutacijsko multivariantno analizo variance nismo našli ($F = 1,6422, P = \text{ns}$; $F = 1,7307, P = \text{ns}$; v tem zaporedju). V vseh štirih regijah je bila *O. bicolor* najpogosteje izolirana gliva (preglednica 21).

V alpski regiji smo našli vse glive razen *Leptographium* sp.-1, v drugih regijah pa po devet različnih vrst gliv. Vrsti *Ceratocystiopsis minuta* in *O. brunneo-ciliatum* sta bili najdeni le v alpski regiji. V asociaciji sta bili le s podlubnikom *I. amitinus*, tega pa smo zabeležili le v alpski regiji, medtem ko sta bila druga dva podlubnika najdena v vseh regijah.

Preglednica 21: Ofiostomatoidne glive izolirane v različnih fitogeografskih regijah Slovenije

Table 21: Ophiostomatoid fungi isolated in different phytogeographic regions in Slovenia

	Alpsko		Dinarsko		Sub-panonsko		Pred-dinarsko		Vsota	%
	Št. ¹	% ²								
<i>Ceratocystis polonica</i>	10	1,6	1	0,2	2	0,3	3	0,5	16	2,6
<i>Ceratocystiopsis minuta</i>	43	6,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0	43	6,9
<i>Graphium fimbriisporum</i>	6	1,0	1	0,2	1	0,2	1	0,2	9	1,4
<i>Grosmannia cucullata</i>	11	1,8	2	0,3	5	0,8	1	0,2	19	3,0
<i>Grosmannia penicillata</i>	38	6,1	0	0,0	2	0,3	1	0,2	41	6,6
<i>Grosmannia piceaperda</i>	35	5,6	7	1,1	2	0,3	4	0,6	48	7,7
<i>Leptographium</i> sp.-1	0	0,0	4	0,6	0	0,0	0	0,0	4	0,6
<i>Ophiostoma ainoae</i>	14	2,2	19	3,0	3	0,5	11	1,8	47	7,5
<i>Ophiostoma bicolor</i>	45	7,2	25	4,0	10	1,6	28	4,5	108	17,3
<i>Ophiostoma brunneociliatum</i>	71	11,4	0	0,0	0	0,0	0	0,0	71	11,4
<i>Ophiostoma fuscum</i>	11	1,8	0	0,0	0	0,0	2	0,3	13	2,1
<i>Ophiostoma piceae</i>	21	3,4	4	0,6	1	0,2	4	0,6	30	4,8
<i>Pesotum</i> sp.-1	3	0,5	1	0,2	1	0,2	0	0,0	5	0,8
Št. izolatov	308		64		27		55		454	
Št. taksonov	12		9		9		9			
Št. vzorcev	407		210		41		211		869	

¹ Število gliv v regiji

² Število gliv v regiji

4.6 ASOCIACIJE MED GLIVNIMI PARI

Naredili smo 105 parov med ofiostomatoidnimi glivami, za primerjavo pa smo dodali tudi neofiostomatoidne glive, izolirane v času raziskave. Izračunali smo korelacijo med glivami, s čimer smo ugotovili, ali se pari gliv statistično značilno pojavljajo. Največkrat korelacija med glivnimi pari ni bila zaznana ali pa je bila le šibko pozitivna oziroma negativna. Korelacijske, ki so bile statistično značilne, so ($P < 0,05$):

- Gliva *O. brunneociliatum* z glivami: *Ceratocystiopsis minuta* ($\tau_b = 0,530$; $P < 0,001$), *O. piceae* ($\tau_b = 0,207$; $P < 0,001$), *G. penicillata* ($\tau_b = 0,343$; $P < 0,001$), *G. fimbriisporum* ($\tau_b = 0,128$; $P < 0,001$), *O. fuscum* ($\tau_b = 0,120$; $P = 0,001$) in kvasovkami ($\tau_b = 0,161$; $P < 0,001$).

- Gliva *Ceratocystiopsis minuta* je imela šibko pozitivno korelacijo z glivo *G. fimbriisporum* ($\tau_b = 0,128$; $P < 0,001$), *O. piceae* ($\tau_b = 0,180$; $P < 0,001$), *G. penicillata* ($\tau_b = 0,132$; $P < 0,001$) in kvasovkami ($\tau_b = 0,135$; $P < 0,01$).
- Gliva *O. piceae* je pokazala pozitivno korelacijo z glivami: *G. fimbriisporum* ($\tau_b = 0,102$; $P < 0,01$), *G. piceiperda* ($\tau_b = 0,110$; $P < 0,01$).
- Nadalje je gliva *G. piceiperda* imela pozitivno korelacijo z glivo *G. cucullata* ($\tau_b = 0,240$; $P < 0,001$).
- Rahlo negativna asociacija pa je bila med glivo *O. ainoae* in kvasovkami ($\tau_b = -0,104$; $P = 0,05$).
- Drugi pari gliv niso pokazali statistično značilnih asociacij.

4.7 TESTI PATOGENOSTI

4.7.1 Množična inokulacija

V raziskavi množične inokulacije navadne smreke smo preučevali različne dejavnike inokulacij (slika 29). V inokulacijah z glivo *C. polonica* (preglednica 22) sta se dve drevesi (6, 10), ki sta bili inokulirani z glivo *C. polonica* (ZLVG348), odmrli. Eno drevo, ki je bilo inokulirano z glivo *C. polonica* (ZLVG349), se je posušilo (7), dve pa sta bili v slabem stanju (11, 14). V primeru nadaljevanja raziskave predvidevamo, da bi se verjetno posušili, saj se je osutost povečala z začetnih 20 na končnih 80 odstotkov. Vsa drevesa, inokulirana z obema izolatomi *C. polonica*, so imela očitnoobarvano beljavo, medtem ko pri kontroli beljava ni bila obarvana (slika 28).

Izločanje smole je bilo pogost pojav po inokulaciji. Večje je bilo pri kontrolnih drevesih kot pri drevesih, inokuliranih z izolati glive *C. polonica* ($F = 4,617$; $P < 0,05$). Test LSD je potrdil razliko v manjšem izločanju smole za oba izolata glive *C. polonica* v primerjavi s kontrolo. Okoli inokulacijskih točk so se v floemu oblikovale nekroze. Nekroze so odziv obrambnega mehanizma rastlin na okužbe patogenih gliv. Dolžina nekroz obeh izolatov glive *C. polonica* so bile statistično značilno različne ($F = 5,892$; $P < 0,1$). Nekroze so bile

globlje in daljše kot pri kontrolnih drevesih, medtem ko se širina nekroz ni statistično razlikovala med izolati glive *C. polonica* in kontrolnimi drevesi (preglednica 22).

Preglednica 22: Rezultati množične inokulacije odraslih dreves s *C. polonica* in s kontrolo brez glivnega micelija, lokacija Litija

Table 22: The results of mass inoculation of mature trees with *C. polonica* and control

Št. ¹	Vrsta	Oznaka ZLVG	1 ²	2 ³	Premer ⁴	Višina ⁵	Smola ⁶	% mrtvega floema	Stanje ⁷	Nekroze ⁸		Obarvanost %
			Osutost (%)	Osutost (%)						Dolžina	Širina	
1	<i>C. polonica</i>	348	20–30	30	23,89	21,5	41	26,84	/	161,3	32,3	46,4
4	<i>C. polonica</i>	348	20–30	30	24,36	24,5	47	20,19	/	36,9	15,6	42,7
5	kontrola	kontrola	20–30	30	27,23	25,5	78	8,50	/	11,3	9,3	0
6	<i>C. polonica</i>	348	30	100	26,27	25,5	14	54,76	p	34,9	14,3	81,8
7	<i>C. polonica</i>	349	30	100	21,66	20,7	20	30,84	p	44,5	8,9	70,6
8	<i>C. polonica</i>	349	20	40	21,97	23,7	1	19,84	/	46,4	9,4	87,1
9	kontrola	kontrola	30	30	22,61	26,6	84	11,61	/	14,7	9,7	0
10	<i>C. polonica</i>	348	20	80	26,75	24,1	4	35,95	p	32,0	6,7	84,4
11	<i>C. polonica</i>	349	20	80	28,03	22,5	36	28,43	s	25,1	11,0	66,4
12	kontrola	kontrola	20	20	27,07	20,2	52	9,87	/	14,7	11,3	0
14	<i>C. polonica</i>	349	20	80	26,11	26,7	20	37,52	s	22,4	17,2	68,1
15	kontrola	kontrola	30	20	20,06	18	29	16,84	/	16,8	14,2	0

Št.¹ = zaporedna oznaka drevesa

Osutost 1² = prvo ocenjevanje osutosti 11. 5. 2010

Osutost 2³ = drugo ocenjevanje osutosti 7. 10. 2010

Premer⁴ in višina⁵ drevesa

Smola⁶ = smola, daljša od 3 mm (x/100 inokulacij)

Stanje⁷ = stanje dreves po inokulacijah: p=posušeno drevo; s=slabo stanje drevesa

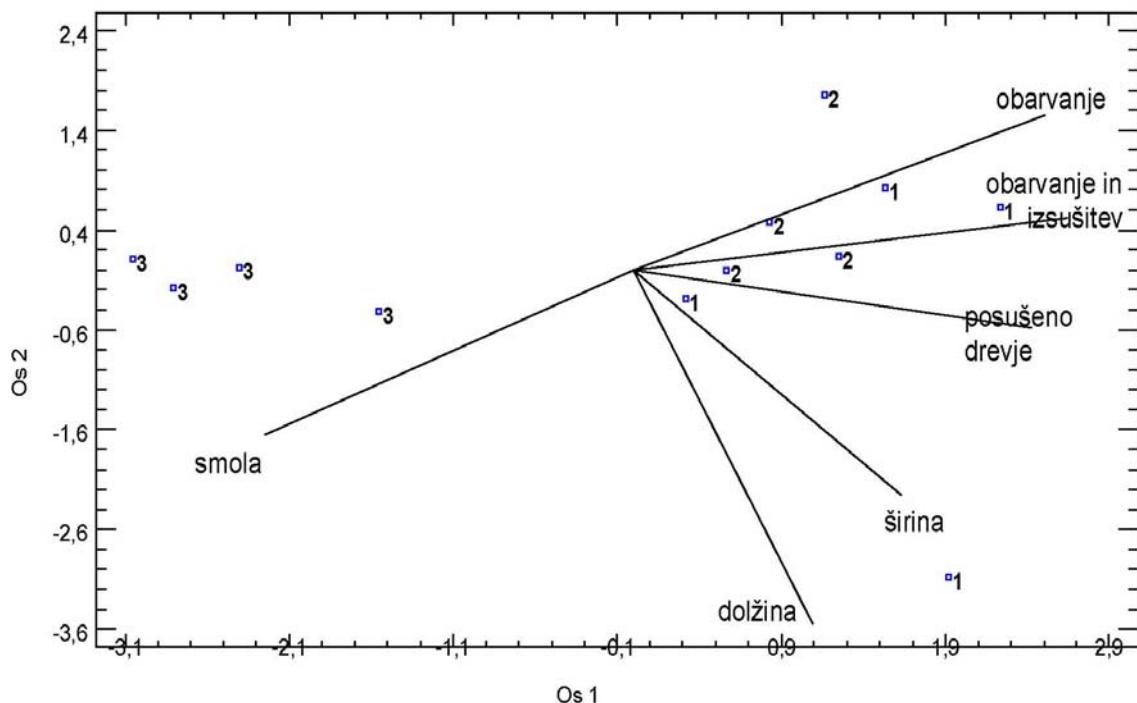
Nekroze⁸ = srednja vrednost nekroze

Izolati *C. polonica* so povzročili obarvanje beljave. 66,9 % beljave po inokulaciji s *C. polonica* je bilo obarvane in se je širilo konično v beljavu. Praktično v vseh drevesih, ki so bila inokulirana s *C. polonica*, se je obarvanost združila v en sam ogromen nekrozni madež. Madež se je širil vzdolžno, nad in pod inokulacijsko točko.



Slika 28: Rezultat množične inokulacije: a) posušeno drevo, slikano na lokaciji Litija (september, 2010), b) obarvanje beljave (oktober 2010)

Figure 28: Results of mass inoculations: a) dead tree on the location Litija (September, 2010), b) sapwood discoloration (October, 2010)



Slika 29: Grafična predstavitev PCA na 12 drevesih navadne smreke; definirana je z dvema osema, ki predstavljata 82,8 % (os 1 = 61,3 %, os 2 = 21,5 %) celotne informacije. 1 = *C. polonica* ZLVG348, 2 = *C. polonica* ZLVG349, 3 = kontrola.

Figure 29: Graphical visualisation of the PCA of 12 *P. abies* trees on the plane of the first two axes: 1 = *C. polonica* ZLVG348, 2 = *C. polonica* ZLVG349, 3 = control.

Pred izvedbo analize PCA smo testirali njeno smiselnost s kriterijem KMO = 0.61 in Bartlettovim testom: 109,664 ($P = 0.000$). Z analizo PCA smo dokazali, da sta izolata glive *C. polonica* podobna in da se delno prekrivata (slika 29), hkrati pa pokazali razliko med kontrolo in izolati glive *C. polonica*. Tok smole je bil znatno večji pri kontroli v primerjavi z izolati *C. polonica* (ANOVA: $F(2, 9) = 4,617, P < 0,05$).

C. polonica je bila uspešno reizolirana iz dreves, potrdili smo Kochove postulate. Pogosto pa so se ob reisolaciji pojavile tudi druge glive *Penicillium* spp., *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp.

4.7.2 Posamične inokulacije

Rezultati so pokazali, da se nekroze (širina in dolžina) med inokuliranimi ofiostomatoidnimi glivami in kontrolo v splošnem ne razlikujejo (preglednica 23). Najdaljše so bile nekroze, ki so se razvile okoli inokulacijskih točk glive *G. piceiperda* (slika 30). Vse glive smo uspešno reizolirali iz inokulacijskih točk.



Slika 30: Nekroza, ki jo je povzročila gliva *G. piceiperda* ob posamični inokulaciji navadne smreke (15. 9. 2010)

Figure 30: Necrotic lesion made by G. piceiperda with low density inoculations of P. abies (15. 9. 2010)

Preglednica 23: Rezultati posamične inokulacije, Litija, 15. 9. 2010

Table 23: The results of low density inoculations, Litija, 15. 9. 2010

Št. ¹	Vrsta	ZLVG oznaka	Osutost ² %	Premer ³	Višina ⁴	Nekroze ⁵ (mm)	
						Dolžina	Širina
2	<i>Ophiostoma ainoae</i>	340	20–30	30,3	25,9	46,3 ^b	15,3 ^a
	<i>Ophiostoma brunneociliatum</i>	342	20–30	30,3	25,9	59,0 ^b	15,0 ^a
2	<i>Ophiostoma fuscum</i>	352	20–30	30,3	25,9	49,5 ^b	15,5 ^a
2	<i>Grosmannia piceiperda</i>	345	20–30	30,3	25,9	107,3 ^c	14,0 ^a
3	<i>Grosmannia penicillata</i>	346	20–30	32,5	23,2	59,5 ^b	11,5 ^a
3	<i>Leptographium</i> sp.-1	351	20–30	32,5	23,2	63,3 ^{bc}	12,3 ^a
13	<i>Ophiostoma bicolor</i>	358	20	31,9	27	62,8 ^{bc}	11,8 ^a
13	<i>Grosmannia cucullata</i>	344	20	31,9	27	39,3 ^a	13,0 ^a
13	<i>Ophiostoma piceae</i>	343	20	31,9	27	31,5 ^a	13,0 ^a
2,3,13	Kontrola	Kontrola				42,0 ^{ab}	10,9 ^a

Vrednosti, ki jim sledijo različne črke, so bile statistično značilno različne ($P < 0,05$) glede na Games-Howellov post hoc test, ki je sledil Kruskal-Wallisovemu testu.

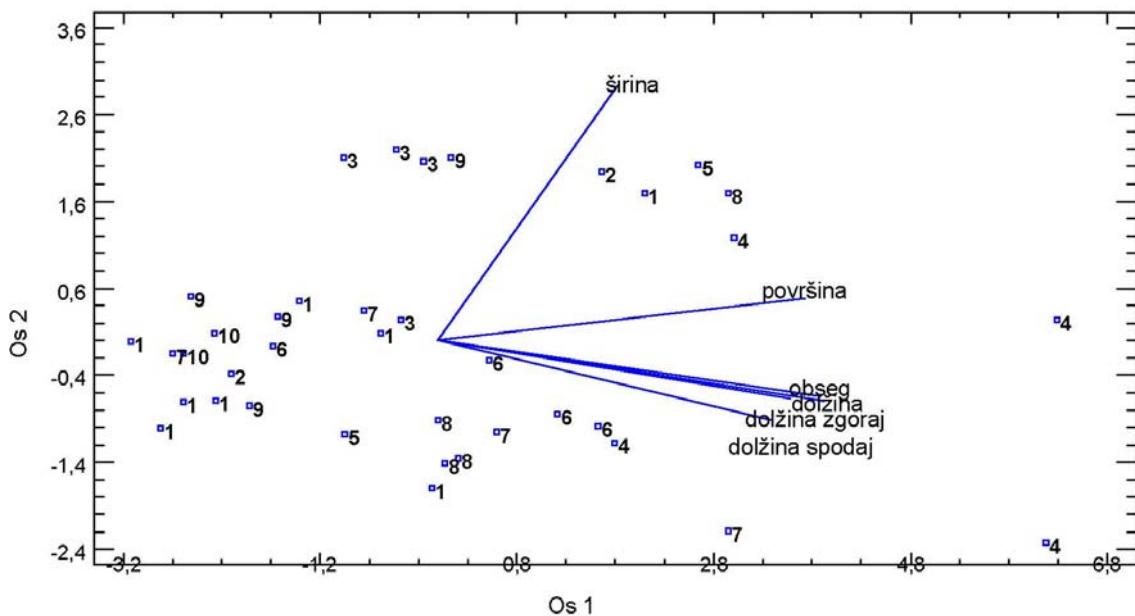
¹ = zaporedna oznaka drevesa

² = ocenjevanje osutosti

³ in ⁴ = premer in višina drevesa

⁵ = srednja vrednost nekroze

Pred izvedbo analize PCA smo testirali njeno smiselnost s KMO-kriterijem = 0,75 in Bartlettovim testom: 281,065 ($P = 0,000$). Z analizo PCA smo dokazali, da se *G. piceiperda* loči od drugih gliv. Gliva *G. piceiperda* se je še posebej razlikovala od drugih (desna stran slike 31, označeno s številko 4). Izolat glice *G. piceiperda* je imel višje vrednosti za vse raziskovane lastnosti.



Slika 31: Grafična predstavitev analize PCA za 38 inokulacij na drevesih navadne smreke na ravnini za prvi dve osi, ki predstavljata 87,7 % (os 1 = 74,3 %, os 2 = 15,2 %) celotne informacije. 1 = kontrola, 2 = *O. fuscum*, 3 = *O. ainoae*, 4 = *G. piceiperda*, 5 = *O. brunneo-ciliatum*, 6 = *Leptographium* sp.-1, 7 = *G. penicillata*, 8 = *O. bicolor*, 9 = *G. cucullata* in 10 = *O. piceae*

Figure 31: Graphical visualisation of the PCA of 38 inoculations of *P. abies* trees on the plane of the first two axes: 1 = control, 2 = *O. fuscum*, 3 = *O. ainoae*, 4 = *G. piceiperda*, 5 = *O. brunneo-ciliatum*, 6 = *Leptographium* sp.-1, 7 = *G. penicillata*, 8 = *O. bicolor*, 9 = *G. cucullata*, 10 = *O. piceae*

4.7.3 Inokulacija sadik navadne smreke v kontroliranih razmerah

Med sadikami se je pet sadik, ki so bile inokulirane z izolatom *C. polonica* (ZLVG348), in šest sadik, ki so bile inokulirane z izolatom *C. polonica* (ZLVG349), posušilo. Nobena izmed kontrolnih sadik se ni posušila, niti tiste, ki so bile inokulirane s sterilnim agarjem, niti nobena neinokulirana. Posušilo se je še pet sadik, ki so bile inokulirane z glivami *Leptographium* sp.-1, *O. ainoae*, *G. penicillata*, *G. piceiperda* in *O. bicolor*. Takoj po odmrtju je bilo pregledano območje ob inokulacijski točki. Te glive so bile izolirane iz pripadajoče sadike (preglednica 24). Vendar pa zaradi premajhnega števila ponovitev ne moremo trditi, da so bile te glive vzrok odmrtja sadik.

Med glivami so obarvanje povzročile le *C. polonica*, *Leptographium* sp.-1 in *O. ainoae*. Izolati *C. polonica* so povzročili obsežna obarvanja lesa od blede do temno modre barve, najpogosteje je bilo obarvanje razširjeno čez ves les. V nasprotju pa so bila kontrolna drevesa in sadike, inokulirane z drugimi glivami, obarvana le nežno oziroma so imela le temen krog okrog rane. Nekroze (preglednica 24) obeh izolatov *C. polonica* so bile statistično značilno daljše kot nekroze drugih gliv (Kruskal-Wallis: $\chi^2 = 19,081$; $P = 0,039$). Nekroze drugih gliv se niso razlikovale med seboj oziroma od kontrole. Inokulirane glive so bile reizolirane iz vseh tkiv okoli nekroz.

Preglednica 24: Rezultati inokulacije sadik, inokulirane glivne vrste, oznake inokuliranih sadik, velikosti nekroz ob inokulacijskih točkah in posušena drevesa

Table 24: The results of the seedling inoculation experiments, size of lesions, dead trees

Št. ¹	Vrsta	ZLVG oznaka	Nekroze ² (mm) Dolžina	Nekroze ² (mm) Širina	Posušena drevesa
5, 11, 15, 19, 29, 38, 39, 41, 43, 47	<i>Ceratocystis polonica</i>	348	31	4,6	5
2, 8, 9, 14, 20, 21, 22, 26, 27, 40	<i>Ceratocystis polonica</i>	349	32,4	4,2	6
42, 57	<i>Ophiostoma ainoae</i>	340	4,8	4,5	1
4, 54	<i>Ophiostoma bicolor</i>	358	9,4	3,0	1
35, 60	<i>Ophiostoma brunneociliatum</i>	342	2,9	0	0
24, 56	<i>Ophiostoma fuscum</i>	352	8,9	0	0
7, 61	<i>Ophiostoma piceae</i>	343	2,9	0	0
34, 46	<i>Grosmannia cucullata</i>	344	14,6	0	0
16, 50	<i>Grosmannia penicillata</i>	346	6,8	2,0	1
28, 53	<i>Grosmannia piceiperda</i>	345	7,5	0	1
10, 17	<i>Leptographium</i> sp.-1	351	6,2	0	1
3, 13, 18, 25, 32, 36, 44, 51, 52, 59	Kontrola	Kontrola	2,2	0	0
6, 12, 23, 30, 31, 33, 37, 45, 48, 49	Kontrola brez inokuluma	Kontrola	0	0	0

¹ = zaporedna oznaka drevesa

² = srednja vrednost nekroz

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V pričajoči raziskavi smo preučevali glivne asociacije smrekovih podlubnikov (Curculionidae: Scolytinae), predvsem pa ofiostomatoidne glive. Preučevali smo tri vrste smrekovih podlubnikov na petih lokacijah v štirih različnih fitogeografskih območjih Slovenije. Hkrati pa je to tudi raziskava asociacijskih gliv smrekovih podlubnikov, ki je do sedaj potekala na najjužnejših evropskih lokacijah. V raziskavi smo izolirali glive iz debla zaprtotrosnic (Ascomycota); nekateri izolati so oblikovali samo nespolne stadije (anamorfe). Podrobneje smo preučili ofiostomatoidne glive, saj nekatere med njimi povzročajo obarvanje beljave in bolezni prevodnih elementov drevesnih vrst, in so tako ekonomsko pomembne za gozd in gozdarstvo. Drugih skupin gliv, ki smo jih pridobili med raziskavo, nismo podrobneje določali, pač pa smo jih označili s frekvenco pojavljanja.

5.1.1 Izolacija ofiostomatoidnih gliv

Raziskava je pokazala, da je mikobiota, povezana s smrekovimi podlubniki *I. amitinus*, *I. typographus* in *P. chalcographus* na petih študijskih območjih v Sloveniji, raznolika. Ofiostomatoidne glive so bile najpogosteje izolirane glive v povezavi s smrekovimi podlubniki; med raziskavo smo izolirali 13 taksonov. O vseh ugotovljenih ofiostomatoidnih vrstah gliv smo v Sloveniji poročali prvič. Med ofiostomatoidnimi glivami smo našli (vrstni red navedb glede na frekvenco pojavljanja): *O. bicolor*, *O. brunneo-ciliatum*, *O. ainoae*, *G. piceaperda*, *G. penicillata*, *Ceratocystiopsis minuta*, *O. piceae*, *G. cucullata*, *C. polonica*, *O. fuscum*, *G. fimbriisporum*, *Pesotum* sp.-1 in *Leptographium* sp.1. Med vsemi ofiostomatoidnimi glivami je bilo najdenih največ vrst iz rodu *Ophiostoma*.

Rezultati pričajoče raziskave so primerljivi s podobnimi raziskavami v različnih delih Evrope: na Norveškem (Solheim, 1986; Krokene in Solheim, 1996), v Avstriji (Kirisits in

sod., 1998; Kirisits in sod., 2000), Franciji (Viiri in Lieutier, 2004; Sallé in sod., 2005), na Poljskem (Jankowiak in sod., 2009) in Finskem (Viiri, 1997; Linnakoski in sod., 2010). Vrste, ki smo jih najpogosteje izolirali, so najpogosteje tudi v raziskavah drugih raziskovalcev. Nekaterih gliv, ki so bile najdene ali so bile celo pogoste drugje, pri nas nismo našli. V nadaljevanju so naštete glive, primerjane s seznamom Kirisitsa (2004), ki jih v naši raziskavi nismo identificirali. Z osmerozobim smrekovim lubadarjem *I. typographus* so bile povezane naslednje glivne vrste, ki jih pri nas nismo našli: *Ceratocystiopsis minuta*, *Ceratocystis alba* DeVay, R. W. Davidson & W. J. Moller, *Leptographium euphyes* K. Jacobs & M.J. Wingf., *Leptographium lundbergii* Lagerb. & Melin, *Ophiostoma tetropii* Mathiesen, *Ophiostoma cainii* (Olchow. & Reid) Harrington, *Ophiostoma araucariae* (Butin) de Hoog & Scheffer, *Ophiostoma obscura* (Davidson) von Arx, *Ophiostoma neglectum* Kirschner & Oberwinkler, *Ophiostoma serpens* (Goid.) Arx, *Ophiostoma stenoceras* (Robak) Nannf. in *O. brunneo-ciliatum*. Na malega osmerozobega smrekovega lubadarja *I. amitinus* se navezujejo naslednje glive, ki jih pri nas nismo našli: *C. alba*, *L. lundbergii* in *O. piliferum*. S šesterozobim smrekovim lubadarjem *P. chalcographus* so povezane glive, ki jih pri nas nismo našli: *Ceratocystiopsis minuta*, *C. polonica*, *G. fimbriisporum*, *Ophiostoma floccosum* Math.-Käärik 1951, *O. araucariae*, *O. neglectum*, *O. serpens* in *O. stenocaurus*.

V naši raziskavi smo odkrili še nekaj nepoznanih asociacij med podlubniki in ofiostomatoidnimi glivami. Glivo *O. fuscum* smo identificirali tudi v povezavi s podlubnikom *I. amitinus*. Glivo *O. ainoae* smo izolirali v visokem deležu v povezavi s podlubnikom *P. chalcographus*, pred tem take povezave niso identificirali. Dodatno smo med raziskavo izolirali še dve vrsti iz rodov *Leptographium* in *Pesotum*. Vendar za zadnji dve vrsti ne moremo z gotovostjo trditi, ali sta bili že izolirani in predstavljeni v drugih raziskavah, saj gre najverjetneje za neopisani vrsti. Po ustni korespondenci z dr. Kirisitsom je gliva iz rodu *Leptographium* po vsej verjetnosti identična tisti, ki je bila odkrita v Avstriji, kjer je bila povezana s podlubnikom *P. chalcographus*, pri nas pa smo jo odkrili tudi v povezavi s podlubnikom *I. typographus*.

Pri preučevanju nabranih vzorcev smo odkrili, da je vrstna sestava asociacijskih gliv odvisna od vrste podlubnika. Analiza združb gliv, ki so bile izolirane na vseh treh vrstah

podlubnikov, je pokazala, da so bili posamezni osebki *I. amitinus* povezani s skoraj istimi vrstami gliv, medtem ko je bila velika razlika v sestavi glivnih združb med posameznimi podlubniki *I. typographus* oziroma *P. chalcographus*. Primerjava vrstne sestave gliv v raziskavi je imela nekatere metodološke omejitve: vsi trije podlubniki niso bili vzorčeni vsako leto in niso bili vzorčeni na vseh krajih. Podlubnike *I. amitinus* smo vzorčili na majhni lokaciji, ker ga najdemo le v nekaterih predelih Slovenije, in to samo v višjih legah. To bi lahko pojasnilo veliko podobnost v združbah gliv med posameznimi osebki *I. amitinus*.

5.1.2 Filogenetska analiza

V raziskavi je bilo narejeno filogenetsko drevo, ki temelji na odseku DNA v genomu gliv, ki zajema regijo 18S rRNA (delno), ITS1, 5,8S rDNA, ITS2 in 28S rRNA (delno). Rezultati analiz filogenetskega drevesa kažejo, da je razvrščanje gliv glede na morfološke znake v skladu z razvrščanjem gliv na osnovi odseka ITS rDNA, kar je tudi v soglasju z ugotovitvami drugih raziskovalcev (Jankowiak in Kolařík, 2010; Linnakoski in sod., 2010). Z molekularnimi analizami smo potrdili morfološko identifikacijo vrst. V filogenetskem drevesu so določene vrste in izbrana zaporedja, pridobljena iz GenBank, združena v monofiletske klade. Izmed ofiostomatoidnih vrst, ki smo jih izolirali, dva taksona, in sicer *Leptographium* sp.-1 in *Pesotum* sp.-1, najverjetnejše predstavljata še neopisani vrsti. Zanju bomo v nadaljevanju uporabili določanje zaporedij tudi z β -tubulin in regijo LSU (velika podenota rDNA oziroma 26S rDNA), saj sta kljub temu, da je analiza rDNA najpogosteje uporabljana metoda za filogenetske raziskave in dobro razvrsti taksoni v robove (Lee, 2006; Jankowiak in Kolařík, 2010; Linnakoski in sod., 2010), za jasnejšo ločitev in določitev vrst pogosto potrebna še dodatna analiza zelo sorodnih taksonov ofiostomatoidnih gliv ter gradnja večgenskih filogenetskih dreves (Zipfel in sod., 2006; Linnakoski in sod., 2010; Nkuekam in sod., 2012). Za natančnejšo ločitev med vrstami je treba uporabiti gene: β -tubulin, regijo LSU in EF-1 (Zipfel in sod., 2006).

V raziskavi smo s filogenetsko analizo jasno pokazali, da je skupina ofiostomatoidnih gliv polifiletična in vključuje različne filogenetske skupine. Ločili smo med vrstami iz reda

Microascales in tistimi iz reda Ophiostomatales. Prav tako so bile jasno izražene različne filogenetske skupine znotraj reda Ophiostomatales, torej vrste *Grosmannia* z anamorfom iz rodu *Leptographium* ter vrste *Ophiostoma* z anamorfi iz rodov *Pesotum*, *Hyalorhinocladiella* in *Sporothrix*. Naši rezultati so primerljivi z raziskavo Zipfel in sod. (2006), kjer so bile jasno izražene monofilogenetske linije v Ophiostomatales, ki se ujemajo z našimi rezultati (slika 25).

5.1.3 Ophiostomatoidne glive in smrekovi podlubniki

Najpogosteje izolirana gliva je bila vrsta *O. bicolor*, kar je v skladu tudi z drugimi evropskimi študijami – na Norveškem (Solheim, 1986), v Avstriji (Kirisits in sod., 2000; Kirisits, 2004) in Franciji (Viiri in Lieutier, 2004; Sallé in sod., 2005). Vrsti *Ophiostoma brunneo-ciliatum* in *Ceratocystiopsis minuta* sta bili najpogosteje izolirani v asociaciji s podlubnikom *I. amitinus*, nista pa bili izolirani v povezavi z drugima dvema smrekovima podlubnikoma. Jankowiak in sod. (2009) ter Kirisits in sod. (2000) so ugotovili, da je vrsta *O. brunneo-ciliatum* pogosto izolirana gliva v povezavi s podlubnikom *I. amitinus* in da je na navadni smreki ta gliva specifično povezana s tem podlubnikom. Kljub temu pa so Linnakoski in sod. (2010) poročali, da je vrsta *O. brunneo-ciliatum* povezana tako s podlubnikom *I. typographus* kot s podlubnikom *P. chalcographus*. Zdi pa se, da je vrsta *O. ainoae* pokazatelj za smreko, medtem ko je vrsta *O. brunneo-ciliatum* pogosteje najdena v asociaciji z različnimi podlubniki na boru (Kirisits in sod., 2000; Kirisits, 2004; Linnakoski in sod., 2010), a tudi v asociaciji s podlubnikom *I. amitinus* na smreki (Kirisits in sod., 2000; Jankowiak in sod., 2009). Glede na vire je vrsta *O. brunneo-ciliatum* povezana tudi s podlubnikom *Ips cembrae* Heer. na macesnu (*Larix decidua* Mill.) (Kirisits in sod., 2000). Zanimivo je, da je drugi najpogostejši gostitelj podlubnika *I. amitinus* – poleg navadne smreke – cemprin (*Pinus cembra* L.). Gliva *O. brunneo-ciliatum* je bila najpogosteje izolirana gliva na podlubniku *I. amitinus* na cemprinu, in sicer tako iz podlubnikov kot iz hodnikov v lesu (Kirisits, 2004). Videti je, da gliva *O. brunneo-ciliatum* (ko nadomešča vrsto *O. ainoae* na podlubnikih *I. typographus* in *P. chalcographus*) odseva povezano podlubnika *I. amitinus* in *P. cembra* kot drugega najpogostejšega gostitelja. Vrste *O. ainoae* še niso našli v povezavi s podlubnikom *I. amitinus* (Kirisits in sod., 2000; Kirisits,

2004), kar je tudi v skladu z našimi ugotovitvami. Če našo raziskavo primerjamo z drugimi, je bila ta vrsta v povezavi s podlubnikom *P. chalcographus* v raziskavah na Poljskem (Jankowiak in sod., 2009) in v Avstriji (Kirisits in sod., 2000) izolirana pogosteje kot pri nas. V nasprotju z našimi ugotovitvami je bila gliva *Ceratocystiopsis minuta* pogosto najdena v povezavi s podlubnikoma *I. typographus* in *P. chalcographus* v drugih evropskih raziskavah (Viiri in Lieutier, 2004; Jankowiak in sod., 2009; Kirisits in sod., 2000; Kirisits, 2004).

Posebno mesto moramo nameniti vrsti *C. polonica*, saj je kot izredno patogena gliva še posebej pomembna za gozdove Slovenije in Evrope. Spada med vrste *Ceratocystis*, ki jih prenašajo le redki evropski podlubniki. Vrsta *C. polonica* je primarni patogen in se pogosto pojavi na zdravih drevesih, zlasti v beljavi. Za prodiranje v beljavo je prilagojena bolje od drugih asociacijskih gliv (Solheim, 1992b; Jankowiak, 2005). Pri nas je bila najdena redkeje kot v nekaterih drugih območjih Evrope. Izolirana je bila samo občasno iz podlubnikov *I. typographus* in *I. amitinus*. Podobne rezultate so imeli npr. v Avstriji (Kirisits in sod., 2000; Kirisits, 2004) in na Poljskem (Jankowiak in sod., 2009). Tudi v drugih evropskih državah je številčnost glive *C. polonica* v asociaciji s podlubnikom *I. typographus* raznolika, saj se giblje od neprisotne, redke do zelo pogoste asociacijske glive (Kirisits, 2004). Občasna povezava patogene glive *C. polonica* in agresivnih podlubnikov v naši raziskavi je v soglasju s študijami Sallé in sod. (2005) ter Giordano in sod. (2012), ni pa primerljiva z raziskavami iz Norveške (Solheim, 1986; Krokene in Solheim, 1996) ali Poljske (Kirisits, 2009), kjer je bila gliva *C. polonica* stalno zabeležena v povezavi s podlubnikom *I. typographus*.

Klasična paradigma trdi, da so patogene glive v povezavi s smrekovimi podlubniki odgovorne za sprožitev obrambnega mehanizma gostiteljskih dreves in za sušitev dreves ter da so predpogoj, da agresivne vrste podlubnikov sploh lahko kolonizirajo drevesa (Paine in sod., 1997). V naši raziskavi se patogena gliva *C. polonica* pojavlja v asociaciji z agresivnima podlubnikoma *I. typographus* in *I. amitinus*, kar je v skladu s teorijo, da so agresivne vrste podlubnikov povezane s patogenimi glivami (Jankowiak in sod., 2009). Vendar se v naši raziskavi patogena gliva *C. polonica* pojavlja redko. Razmeroma redko najdbo glive *C. polonica* lahko pojasnimo z dejstvom, da jo je težko izolirati

neposredno iz podlubnikov, še zlasti ker ne poznamo nobenih selektivnih gojišč prav za vrste iz rodu *Ceratocystis* (Kirisits, 2009). Predvidevamo, da bi z uporabo drugačnih izolacij gliv, iz drugih substratov, dobili drugačne rezultate. Drugačna metodologija izoliranja gliv, iz različnih niš, bi lahko pojasnila, zakaj je bila ta vrsta izolirana le občasno (Yamaoka in sod., 1997; Viiri in Lieutier, 2004). Vendar pa redka pojavnost patogenih gliv lahko potrjuje tudi teorijo Six in Wingfielda (2011), ki nasprotuje klasični paradigm in trdita, da je glivna patogenost pomembna le za glivo samo, in ne za njenega vektorja.

Vrsti *G. piceiperda* in *G. penicillata* v Sloveniji nista bili pogosto najdeni v asociaciji s podlubnikoma *I. typographus* in *P. chalcographus*, kar je v nasprotju z rezultati v Evropi (Kirisits, 2004; Sallé in sod., 2005). Kljub temu sta bili pogosto v asociaciji s podlubniki *I. amitinus*, kar je podobno kot na Poljskem (Jankowiak in sod., 2009), kjer je bila vrsta *G. piceiperda* pogosta asociacijska gliva podlubnika *I. amitinus*, ali v Avstriji (Kirisits in sod., 2000), kjer je bila vrsta *G. penicillata* precej pogosta v asociaciji s podlubnikom *I. amitinus*.

Vrsta *O. piceae* je bila najpogosteje v asociaciji s podlubnikom *I. amitinus*, kar je podobno izsledkom poljske raziskave (Jankowiak in sod., 2009). Omenjeno glivo so z drugima dvema podlubnikoma zasledili manj pogosto. V raziskavi so bile druge ofiostomatoidne glive (*G. cucullata*, *G. fimbriisporum*, *O. fuscum*, *Leptographium* sp.-1, *Pesotum* sp.-1) izolirane z nizkimi frekvencami. Vrsto *O. fuscum* so opisali Linnakoski in sod. (2010), bila je v asociaciji s podlubnikoma *I. typographus* in *P. chalcographus*, v Sloveniji pa smo jo našli v asociaciji s podlubnikoma *P. chalcographus* in *I. amitinus*. Gliva *G. fimbriisporum* ni bila v asociaciji s podlubnikom *P. chalcographus*, kljub temu da je bila v nekaterih drugih evropskih raziskavah pogosto najdena v taki povezavi (Kirisits in sod., 2000; Kirisits, 2004).

5.1.4 Glive v asociaciji z različnimi življenjskimi stadiji podlubnika in rovnimi sistemi v lesu

Glive smo izolirali tudi iz rovnih sistemov v lesu in iz različnih življenjskih stadijev podlubnikov. V vseh substratih smo našli asocirane ofiostomatoidne glive. Največ vrst ofiostomatoidnih gliv smo izolirali iz imagov, najmanj pa iz larv. Na posamezen osebek je bilo največ ofiostomatoidnih gliv na bubah, kar je lahko razložiti, saj se larve pri prehranjevanju premikajo globlje in se lahko pregrizejo pred mejo glivne kolonizacije. Ko se zabubijo v bobilnicah, se okoli njih tvorijo goste plasti micelija in razmnoževalnih struktur gliv. Mladi osebki podlubnikov se pri prehranjevanju pod skorjo matičnega drevesa in ob ekloziji inokulirajo s trosi gliv ter povežejo z delci micelijev; tako postanejo vektorji (asociacijskih) gliv (Kirisits, 2004).

Najmanj gliv smo izolirali iz lesa, saj glive v les prodirajo počasi. Verjetno bi v daljšem raziskovalnem obdobju ugotovili in določili več vrst gliv. Hitrost kolonizacije je odvisna od temperature in odstotka vlage ter, posledično, od količine kisika. Prva gliva, ki kolonizira beljavo smreke ob napadu podlubnikov *I. typographus*, je vrsta *C. polonica*, sledijo ji vrste *O. bicolor*, *G. penicillata* in *O. ainoae* (Solheim, 1992b). Vrsta *C. polonica* uspeva tudi pri nizki količini vsebnosti kisika, poleg tega pa zelo hitro raste, kar je ustrezna kombinacija ugodnih dejavnikov za primarno kolonizacijo dreves (Solheim, 1992b).

Znano je, da podlubniki *I. amitinus* kolonizirajo tanjše dele dreves, zato jih najdemo više na deblu (Jurc in Bojović 2004; Okland in Skarpaas, 2008). Na višini 0,5 m od tal ni bilo močnega napada podlubnikov, prav tako na tej višini nismo izolirali veliko gliv. Z višino mesta jemanja vzorcev na deblu od tal je naraščalo število izoliranih gliv.

5.1.5 Asociacije med glivnimi pari

Interakcije med glivami in podlubniki se spreminjajo glede na okolje, čas in prostor, kar lahko poimenujemo »odvisnost glede na kontekst« (Klepzig in sod., 2001). Te interakcije pa so odvisne tudi od odnosov do drugih gliv in drugih endofitnih organizmov, kot so npr.

kvasovke in bakterije (Alamouti in sod., 2007). Nekatere glive v raziskavi so se večkrat pojavljale v povezavi z drugimi glivami. Npr. vrsta *O. brunneo-ciliatum* je bila pogosto izolirana skupaj z drugimi glivami, prav tako tudi vrsti *Ceratocystiopsis minuta* in *O. piceae*. Skupno pojavljanje vrst *G. piceiperda* in *G. penicillata* na posameznem podlubniku ni bilo značilno za naše razmere, rezultati francoske raziskave pa potrjujejo omenjeno povezavo (Viiri in Lieutier, 2004). Na splošno naši rezultati kažejo, da se večina parov gliv pojavlja skupaj samo naključno.

5.1.6 Patogenost ofiostomatoidnih gliv

Z raziskavo patogenosti gliv na navadni smreki na terenu smo pokazali, da je gostiteljsko drevo vidno reagiralo na inokulacije z ofiostomatoidnimi glivami. Z inokulacijami smo sprožili vgrajeni obrambni mehanizem (smoljenje iz inokulacijskih točk) in izzvali odziv gostiteljskega drevesa na inokulacije (nekroze, odmiranje floema, obarvanje in izsušitev beljave). Opazili smo razlike v odzivih gostiteljskega drevesa na inokulacije z različnimi glivami.

5.1.6.1 Množične inokulacije odraslih dreves in inokulacije sadik

Za prikaz in potrditev glivne patogenosti smo se odločili za množične inokulacije odraslih dreves in inokulacije sadik. Množične inokulacije so posnemanje naravne inokulacije, ki sledi množičnemu napadu podlubnikov (Christiansen, 1985). Zaradi večjega nadzora okoljskih vplivov pa so najboljša izbira za poizkuse inokulacij sadike (Matusick, 2010). Kot sta v svoji raziskavi ugotovila Krokene in Solheim (1998a), je inokulacija sadik primerljiva z inokulacijami odraslih dreves in primerna za določanje virulence gliv, ki živijo v asociaciji s podlubniki.

Rezultat obeh delov raziskave patogenosti glive *C. polonica* z množično inokulacijo v odrasla drevesa in sadike navadne smreke je bil podoben. V obeh primerih je v opisanih razmerah gliva *C. polonica* patogen, ki je sposoben povzročiti sušenje dreves. Odstotek

posušenih oziroma oslabljenih dreves je bil v obeh delih raziskave enak. Rezultati so očitno pokazali oziroma potrdili prejšnje raziskave na Danskem (Horntvedt in sod., 1983), v Avstriji (Kirisits, 1998) in na Norveškem (Krokene in Solheim 1998b; Solheim, 1988), da je gliva *C. polonica* v zadostnih količinah patogen in da je sposobna sprožiti sušenje zdravih odraslih dreves ali sadik na Norveškem (Krokene in Solheim, 1998a) oziroma Poljskem (Jankowiak in Kolařík, 2010). Inokulacija odraslih dreves in sadik z glivo *C. polonica* je sprožila razvoj vidnih simptomov na gostiteljskem drevesu, kot so nekroze okoli inokulacijskih točk, izsušena in obarvana beljava ter izločanje smole. Dolžine nekroz so bile podobne tistim, ki so jih ugotovili na Norveškem (Krokene in Solheim, 1998a; 1998b; Solheim, 1988) in so bile daljše od kontrole oziroma v primeru sadik tudi daljše od nekroz drugih ofiostomatoidnih gliv. Obarvanje beljave je bilo prav tako večje kot kontrolno pri inokulacijah odraslih dreves in sadik ter večje kot v primeru drugih gliv pri inokulaciji sadik.

Drevesa na inokulacijo z glivami praviloma reagirajo z intenzivnim smoljenjem (Reid in sod., 1967). Vendar glive v svojih metabolnih procesih porabljam sladkorje iz floema, ki je potreben za proizvodnjo smole (Lee, 2006), kar bi bila možna razлага, zakaj je bilo smoljenje ob inokulaciji z glivo *C. polonica* manjše kot inokuliranje s kontollo. Rezultati pa lahko nakazujejo, da je gliva *C. polonica* s hitro rastjo obšla obrambno smoljenje iglavcev in tako hitro blokirala smolne kanale, kot so predvidevali Paine in sod. (1997). Podobne rezultate o jakosti smoljenja je pridobil Kirisits (1998), v drugih raziskavah pa so ugotovili ravno obratno, da je smoljenje dreves inokuliranih s patogeno glivo močnejše (Krokene in Solheim, 1998b; Solheim, 1988).

Odstotek odmrlega in obarvanega lesa se v različnih študijah giblje od 25 % beljave na Norveškem (Solheim, 1988) ali 53,2 % oziroma 77,9 % (Krokene in Solheim, 1998b) do več kot 75 % v Avstriji (Kirisits, 1998). Naši rezultati – 83,9 % – najbolj ustrejajo rezultatom v Avstriji, kjer je inokulacija z glivo *C. polonica* obarvala in nekrotirala velik del beljave. Razlika med raziskavami se lahko pojavi zaradi različnih okoliščin, v katerih je potekala raziskava, lahko je odvisna od starosti drevesa, časa inokulacije ter časa, ki je potekel med inokulacijo in podrtjem drevesa.

5.1.6.2 Inokulacije nizke gostote in inokulacije sadik

Inokulacije nizke gostote smo opravili z namenom ponazoriti sposobnost gliv, da sprožijo obrambni mehanizem dreves (Lieutier in sod., 2009). Glive, ki sprožajo obrambne mehanizme rastlin, pripomorejo k zmanjševanju kritične točke (praga) gostote napada podlubnikov (Sallé in sod., 2005). Inokulacije nizke gostote ne prikažejo najbolj reprezentativno glivne agresivnosti in glivne virulence, ki je povezana z obrambnimi sposobnostmi gostiteljskega drevesa. Nekatere glive sprožijo razvoj velikih nekroz, vendar beljave ne poškodujejo (Krokene in Solheim, 1999; Sallé in sod., 2005). Lahko pa kljub temu z nekrozami obročkajo drevo, torej poškodujejo kambij ter prevodne sisteme v skorji in beljavi ter povzročijo sušenje dreves.

Patogenost ofiostomatoidnih gliv *O. ainoae*, *O. brunneo-ciliatum*, *O. fuscum*, *G. cucullata* in *Leptographium* sp.-1. še ni bila testirana v drugih raziskavah, medtem ko je bila patogenost gliv *C. polonica*, *Ophiostoma bicolor*, *O. piceae*, *G. penicillata* in *G. piceiperda* testirana v evropskih državah, kot so Norveška (Solheim, 1988), Avstrija (Kirisits, 1998), Poljska (Jankowiak in Kolařík, 2010) in Francija (Sallé in sod., 2005). Glive, ki smo jih inokulirali v poskusu inokulacij z posamičnimi inokulacijami odraslih dreves in poskusu inokulacij sadik, večinoma niso bile močno virulentne. Vse glive so v inokulacijah sadik povzročile večje nekroze kot kontrola. V primeru inokulacij z nizko gostoto pa ni bilo tako. Vrsti *O. piceae* in *G. cucullata* sta povzročili krajše nekroze od kontrole. Vrste *O. ainoae*, *O. bicolor*, *G. penicillata*, *G. piceiperda* in *Leptographium* sp.-1 so pokazale določeno stopnjo patogenosti. Nekaj sadik, inokuliranih z omenjenimi glivami, se je posušilo. Glive so možen vzrok za sušenje sadik, česar pa zaradi majhnega števila ponovitev – opravljeni sta bili samo dve – ne moremo potrditi. Sadike, ki so se posušile, bi mogoče preživele, če bi bile starejše in močnejše. Basham (1970) je ugotovil, da so mlajše dveletne sadike borov, inokulirane z ofiostomatoidnimi glivami, manj odporne na infekcije kot starejše, 13-letne mladike.

Inokulacije sadik z vrstama *G. penicillata* in *G. piceiperda* niso povzročileobarvanja, prav tako gliva *G. piceiperda* ni povzročila daljših nekroz kot druge glive, kot so ugotovili v

raziskavi na Poljskem (Jankowiak in Kolařík, 2010). Posamične inokulacije z vrstama *G. penicillata* in *G. piceiperda* so, tako kot v Franciji (Sallé in sod., 2005), povzročile najdaljše nekroze. Tudi Kirisits (1998) v Avstriji je ugotovil, da gliva *G. piceiperda* povzroča dolge in široke nekroze, gliva pa ne prodre globoko v beljavo. Vendar je sposobna sprožiti obrambni sistem dreves in je tako ena izmed gliv, ki lahko igrajo pomembno vlogo v kolonizaciji podlubnikov. Drugi glivni takson, ki je sprožil močnejši obrambni odziv dreves, je bil *Leptographium* sp.-1, ki je ravno tako povzročil dolge nekroze in obarvanje beljave. Vrste, ki povzročajo velike nekroze, vendar jim ne uspe prodreti globoko v beljavo, lahko z obročkanjem in razkrojem kambija ter prekinitevijo prevodnih tokov rastline v ksilemu in floemu prekinejo tok rudninskih snovi in hrani ter tako poškodujejo ali povzročijo sušenje gostiteljskega drevesa.

V prejšnjih raziskavah (Kirisits, 1998; Sallé in sod., 2005; Solheim, 1988) in pričujoči raziskavi smo ugotovili le majhno stopnjo virulence glive *O. bicolor*. V primeru nizke gostote inokulacij odraslih dreves in inokulacije sadik je gliva *O. piceae* pokazala najnižjo mero virulence, kar je bilo ugotovljeno tudi na Norveškem (Krokene in Solheim, 1998a), medtem ko je na Poljskem sprožila dolge nekroze na inokuliranih drevesih (Jankowiak in Kolařík, 2010). Gliva *O. brunneo-ciliatum* ni zelo virulentna (Guérard in sod., 2000) do *Pinus sylvestris*, in to smo potrdili tudi v raziskavi, vendar za navadno smreko kot gostiteljsko rastlino. Tudi glivi *O. fuscum* in *G. cucullata* nista pokazali visoke stopnje virulentnosti.

5.2 SKLEPI

5.2.1 Zastavljeni raziskovalni hipoteze z odgovori

1. Biodiverziteta ofiostomatoidnih gliv na smrekovih podlubnikih v Sloveniji je pestrejša v primerjavi z vrstno sestavo omenjenih gliv v srednjeevropskih gozdovih.

Vsi trije raziskovani podlubniki so bili pogosto v asociaciji z glivami, predvsem ofiostomatoidnimi. Ofiostomatoidne glive v Sloveniji so splošno razširjene; v raziskavi smo odkrili 13 taksonov. Na splošno izolirane glive predstavljajo vrste, ki so tipične za to regijo in za smrekove podlubnike. V združbi ofiostomatoidnih gliv v Sloveniji nismo našli enajstih vrst v povezavi s podlubnikom *I. typographus*, osmi vrst v povezavi s podlubnikom *P. chalcographus* in treh vrst v povezavi s podlubnikom *I. amitinus*, ki so jih našli drugi raziskovalci v ekološko podobnih razmerah (Kirisits, 2004). Najdene pa so bile nekatere druge povezave: ena gliva v povezavi s podlubnikom *P. chalcographus* in ena gliva v povezavi s podlubnikom *I. amitinus* ter do sedaj še neopisana taksona *Leptographium* sp.-1 in *Pesotum* sp.-1. Kljub temu da je bila naša raziskava osredotočena le na tri najnevarnejše podlubnike na ekonomsko najpomembnejši drevesni vrsti Slovenije, navadni smreki, različnost ugotovljenih gliv nakazuje, da je diverziteta gliv v tem delu Evrope velika.

2. Ofiostomatoidne glive, ki živijo v asociaciji s smrekovimi podlubniki v naših razmerah, so patogene, slabijo obrambne sisteme dreves in lahko celo povzročijo sušenje dreves.
 - Patogenost posameznih izolatov asociacijskih gliv smrekovih podlubnikov je različna.
 - Virulentnost gliv, ki živijo v povezavi s smrekovimi podlubniki, se spreminja in je odvisna od lastnosti posameznih dreves smreke.

Smrekova drevesa, odrasla in sadike, so različno reagirala na inokulacije z ofiostomatoidnimi glivami. Nekatere izolirane glive so se izkazale kot patogene za navadno smreko. Sprožile so obrambni mehanizem dreves, ki se odraža kot intenzivno smoljenje, odmiranje floema,obarvanje, izsušitev beljave in sušenje dreves. Inokulaciji z različnimi glivami so sledili različni odzivi dreves. Testirana izolata glive *C. polonica* sta sposobna močno oslabiti obrambni mehanizem gostiteljskega drevesa ter povzročiti sušenje sadik in odraslih dreves navadne smreke. Tudi nekateri izolati drugih gliv so pokazali patogenost do navadne smreke, npr. *G. piceiperda* v inokulacijah odraslih dreves ali *Leptographium* sp.-1, *O. ainoae*, *G. penicillata* in *O. bicolor* v inokulacijah sadik. Izolati *G. piceiperda* so v inokulacijah odraslih dreves pokazali več patogenosti od drugih

(slika 31: *G. piceiperda* označena s številko 4, skrajno desno). V raziskavi se je torej pokazalo, da se virulentnost gliv dejansko spreminja v odvisnosti od lastnosti posamičnih dreves, denimo od starosti dreves. Vsekakor moramo biti previdni (npr. pri inokulaciji sadik sta bili za vsako glivo le dve ponovitvi), saj je za to trditev potrebno še nadaljnje intenzivno raziskovanje na drugih primerih.

3. Patogenost asociacijskih gliv je sprožilni dejavnik, ki pri napadu smrekovih podlubnikov še dodatno poveča njihovo agresivnost in posledično sušenje smrekovih sestojev.

V raziskavi ofiostomatoidnih gliv smo ugotovili, da so nekatere patogene in sprožajo obrambni mehanizem dreves ter vplivajo na prevodni sistem gostiteljskega drevesa. To je za drevo nevarno in so dodaten dejavnik sušenja dreves, povezan s podlubniki. Glive okužijo prevodni sistem vitalnega drevesa, kar povzroči prekinitve transporta vode, hranil in nastalih asimilatov ter se konča s sušenjem drevesa. Glive, ki sprožajo obrambne mehanizme rastlin, pripomorejo k zmanjševanju kritične točke, praga, gostote napada podlubnikov (Sallé in sod., 2005). Ofiostomatoidne glive skupaj s podlubniki spremenijo in poškodujejo prevodna tkiva dreves, čemur sledi prekinitve transporta snovi in končno prezgodnje odmiranje dreves v vseh razvojnih stopnjah. Nekatere ofiostomatoidne glive, ki so povezane s podlubniki vplivajo na vse funkcije zdravega gozda, saj se zaradi njihove patogenosti potencialno poveča pogostost in intenzivnost sanitarnih sečenj.

4. Asociacija ofiostomatoidnih gliv z določenimi vrstami podlubnikov zaradi medsebojne vrstno specifične navezanosti predstavlja koevolucijsko mutualistično simbiozo.

Ali ti dve tesno povezani skupini, podlubniki in ofiostomatoidne glive, vplivata na razvoj druga druge oziroma ali je povezava med njima ugodna za oba udeleženca? Vsi podlubniki so vektorji asociacijskih gliv (Six, 2003; Kirisits, 2004). Tudi rezultati naše raziskave kažejo, da so vsi trije raziskovani podlubniki vektorji gliv, predvsem ofiostomatoidnih. Podobne vrste gliv se pojavljajo na vseh treh raziskovanih podlubnikih, čeprav se njihove vrstne sestave spreminjajo. Noben izmed raziskovanih podlubnikov pa ni živel v asociaciji

s samo eno specifično glivo. Za raziskovane vrste podlubnikov tudi v drugih raziskavah niso odkrili glivnih vrst, specifično povezanih z njimi (Kirisits, 2004). Povezanost podlubnikov in asociacijskih gliv naše raziskave je torej večpartnerska, vendar iz rezultatov ne moremo sklepati, da je njihova simbioza obvezna. Simbioza je obvezna takrat, ko sta oba partnerja močno prilagojena drug na drugega (Paracer in Ahmadjian, 2000). Vloga ofiostomatoidnih gliv v asociaciji s podlubniki ostaja bolj ali manj nepojasnjena. Podlubniki in njihove asociacijske glice so razvili morfološke adaptacije drug na drugega med svojim sobivanjem. Ofiostomatoidne glice imajo korist od simbioze. Podlubniki so njihovi vektorji, ki glice prenašajo in vnašajo na nova gostiteljska drevesa, na kar so se glice z evolucijo popolnoma prilagodile. Glivna reproduktivna telesa so steljke, koremiji in periteciji z dolgimi vratovi, na vrhu katerih so lepljive kapljice trosov, ki se z lakkoto prilepijo na telo vektorjev (Upadhyay, 1981).

V raziskavi smo naredili poizkus patogenosti, kjer smo z množično inokulacijo tretirali smrekova drevesa; rezultati so pokazali, da je ofiostomatoidna gliva *C. polonica* sposobna sama, brez podlubnikov, tako oslabiti drevo, da to propade. Ravno tako je bilo smoljenje ob množični inokulaciji z glivo *C. polonica* značilno manjše kot pri inokulaciji s kontrolo. Lieutier in sod. (2009) pa predvidevajo celo, da lahko tudi nepatogene glice prispevajo k lažji kolonizaciji drevesa podlubnikov, s tem da stimulirajo obrambne sisteme dreves, kot npr. gliva *G. piceiperda* in ostale nekoliko patogene glice v naši raziskavi.

Čeprav asociacije floemofagnih podlubnikov in določenih vrst gliv nedvomno ustrezajo kriterijem, ki so značilni za simbioze, ni jasnega odgovora na vprašanje, ali gre za mutualizem (Harrington, 1993; Paine in sod. 1997). Verjetno sta stopnja in tip odvisnosti različna za vsakega posameznega podlubnika z asociacijsko glivo (Kirisits, 2004), saj je odvisna od razvoja, vpliva abiotskih dejavnikov ter medsebojnega delovanja partnerjev z gostiteljskim drevesom in drugimi pripadniki okolja (Six, 2012).

5.2.2 Kako v prihodnje prepoznati negativne vplive obravnavane skupine gliv na sestoje in kako jih preprečiti?

Ofiostomatoidne glive so potencialne povzročiteljice obarvanja beljave in bolezni prevodnih elementov, ki povzročajo sušenje sestojev v kombinaciji z drugimi škodljivimi biotskimi in abiotiskimi dejavniki v okolju ter znižujejo ceno lesa. Ofiostomatoidne glive ob napadu podlubnikov kolonizirajo živa drevesa, drevesa na sečišču ali med prevozom (Schroeder in sod., 2001). Razvoj obarvanja beljave je odvisen od časa spravila lesa pa tudi od vrst ofiostomatoidnih gliv v gostiteljski rastlini. V raziskavi v Avstriji je Friedl (2004) preučeval spravilo lesa ter razvil model za ugotavljanje najdaljšega možnega spravila lesa v odvisnosti od letnega časa in povprečne dnevne temperature. Ugotovil je, da je najdaljši možni čas spravila lesa 3–4 tedne v poletnem času in 15 tednov v zimskem času. Ofiostomatoidne glive v Sloveniji obstajajo tako na iglavcih kot na listavcih. Ob prerazmnožitvi podlubnikov, njihovih vektorjev, pride do večjega prenosa ofiostomatoidnih gliv. V zadnjih letih so ofiostomatoidne glive vse večji problem na smreki, pred tem so večjo škodo povzročale le na borih (Friedl, 2004).

Ofiostomatoidne glive pomenijo nevarnost v spremenjenih oziroma novih okoljih. S spremembou okolja, npr. segrevanjem ozračja ali vnosom novih vrst (trgovina z lesom), pa lahko postanejo pomembni patogeni. Pomemben pogled je tudi vnos novih ofiostomatoidnih gliv s trgovino sadik, lesa in lesnih proizvodov. Glive, ki v domačem okolju ne povzročajo večje škode, lahko v novem okolju, na novem gostitelju, pomenijo pravo katastrofo (Gibbs, 1993). Taki primeri so se v zgodovini že zgodili (npr. holandska brestova bolezen), povzročili so ogromne izbruhe bolezni, z ekonomskim in ekološkim opustošenjem gozda ter urbanega okolja (Kirisits, 2013). Potencialno tveganje je veliko, saj gostitelji v novih okoljih nimajo prilagojenih obrambnih mehanizmov za nove patogene. Poleg tega pa je prenos z žuželkami zelo primeren za hiter prenos (Seifert in sod., 2006).

Potrebno je nadaljnje preučevanje ofiostomatoidnih gliv v različnih ekoloških razmerah, raziskati je treba njihovo vlogo v bioekologiji različnih podlubnikov in patogenosti do različnih drevesnih vrst. Pospešiti je treba raziskave na področju sprememb okolja in posledično sprememb vpliva ofiostomatoidnih gliv na gozdove. Vse morebitne ukrepe integralnega varstva gozdov, ki bi sledili novim spoznanjem, bo nujno pretehtati v kontekstu multifunkcionalnosti gozda ter umnega gospodarjenja z gozdom in krajino

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

V disertaciji obravnavamo asociacijske glive treh smrekovih podlubnikov: osmerozobega smrekovega lubadarja (*I. typographus*), šesterozobega smrekovega lubadarja (*P. chalcographus*) in malega osmerozobega smrekovega lubadarja (*I. amitinus*) v Sloveniji. Poudarek raziskave je bil na glivah, znanih pod skupnim imenom ofiostomatoidne glive, ki sestavljajo skupino različnih rodov iz debla Ascomycota. Ti rodovi so *Ophiostoma* Syd. & P. Syd., *Ceratocystis* Ellis & Halst., *Ceratocystiopsis* H. P. Upadhyay & W. B. Kendr., *Grosmannia* Goid., kakor tudi nespolne oblike *Leptographium* Lagerb. & Melin, *Pesotum* J. L. Crane & Schokn., *Sporothrix* Hektoen & C. F. Perkins, *Hyalorhinocladiella* H. P. Upadhyay & W. B. Kendr., *Thielaviopsis* Went in *Graphium* Corda. Ofiostomatoidne glive se najpogosteje pojavljajo na lesnatih rastlinah in so lahko vzrok za številne bolezni: obarvanja beljave (primarne glive modrivke) ali bolezni prevodnega sistema gostiteljskega drevesa. Največjo gospodarsko škodo povzročajo na iglavcih severne poloble. Za poznavanje biologije ofiostomatoidnih gliv je pomemben vpogled v tritrofični odnos med glivo, hroščem in gostiteljskim drevesom.

Ofiostomatoidne glive smo obravnavali v treh sklopih: v prvem smo se ukvarjali s taksonomijo in filogenijo determiniranih vrst, v drugem sklopu smo iskali povezanost asociacijskih gliv z različnimi vrstami podlubnikov in njihovimi razvojnimi stadiji ali okuženostjo lesa, tretji skop pa je obsegal patogenost raziskovanih gliv do gostiteljskega drevesa.

Asociacijske glive treh smrekovih podlubnikov smo raziskovali na petih lokacijah (Boršt, Ig, Pugled, Vučja jama, Košenjak) v štirih različnih fitogeografskih območjih Slovenije (alpsko, dinarsko, predinarsko, subpanonsko), v letih 2008–2010. Skupno smo nabrali 624 osebkov podlubnikov *P. chalcographus*, *I. typographus* in *I. amitinus*, 40 bub, 40 larv in 158 vzorcev rovnih sistemov podlubnika *I. amitinus*. Sprva smo glive določili z mikroskopom in lupo s klasično morfometrično metodo. Določili smo 13 različnih

taksonov ofiostomatoidnih gliv: *Ceratocystis polonica* (Siemaszko) C. Moreau, *Ceratocystiopsis minuta* (Siemaszko) H. P. Upadhyay & W. B. Kendr., *Graphium fimbriisporum* (M. Morelet) K. Jacobs, Kirisits & M. J. Wingf., *Grosmannia cucullata* (H. Solheim) Zipfel, Z. W. de Beer & M. J. Wingf., *Grosmannia penicillata* (Grosmann) Goid., *Grosmannia piceiperda* (Rumbold) Goid., *Leptographium* sp.-1, *Ophiostoma ainoae* H. Solheim, *Ophiostoma bicolor* R. W. Davidson & D. E. Wells, *Ophiostoma brunneo-ciliatum* Math.-Käärik, *Ophiostoma fuscum* Linnak., Z. W. de Beer & M. J. Wingf, *Ophiostoma piceae* (Münch) Syd. & P. Syd. in *Pesotum* sp.-1.

Med ofiostomatoidnimi glivami so si glive po pogostnosti sledile v tem vrstnem redu: *O. bicolor*, *O. brunneo-ciliatum*, *O. ainoae*, *G. piceaperda*, *G. penicillata*, *Ceratocystiopsis minuta*, *O. piceae*, *G. cucullata*, *C. polonica*, *O. fuscum*, *G. fimbriisporum*, *Pesotum* sp.-1, *Leptographium* sp.-1. Na splošno so izolirane iste glivne vrste, ki so tipične za preučevano regijo in smrekove podlubnike. V združbi ofiostomatoidnih gliv v Sloveniji nismo ugotovili nekaterih vrst, ki so jih našli drugi raziskovalci v ekološko podobnih razmerah srednje Evrope. Najdene pa so bile nekatere druge vrste in verjetno do sedaj še neopisana taksona *Leptographium* sp.-1 in *Pesotum* sp.-1. Kljub temu da je bila naša raziskava osredotočena na tri najnevarnejše podlubnike na ekonomsko najpomembnejši drevesni vrsti Slovenije, navadni smreki (*P. abies*), različnost ugotovljenih gliv nakazuje, da je diverziteta asociacijskih gliv v tem delu Evrope velika.

V preteklosti so bile na osnovi morfoloških in ekoloških znakov vrste skupine ofiostomatoidnih gliv uvrščene v skupni red. Vrste v okviru ofiostomatoidnih rodov so si morfološko podobne. Ker določanje samo z morfološkimi tehnikami zaradi podobnosti preučevanih znakov ni vedno zanesljivo, za dodatno potrditev uporabljamo molekularne metode, ki temeljijo na nukleotidnih zaporedjih DNA.

Za določanje genotipskih lastnosti gliv smo za vsako morfološko določeno vrsto pripravili skupino vzorcev. V analizo smo vključili 71 izolatov gliv. DNA smo ekstrahirali z metodo CTAB za izolacijo DNA iz rastlinskega tkiva. Sledila je metoda verižne reakcije s polimerazo (PCR) in sekvenciranje produkta za določitev zaporedij DNA. V filogenetsko analizo smo vključili 21 nukleotidnih zaporedij odseka ITS rDNA, ki smo jih pridobili med raziskavo, in 15 referenčnih zaporedij odseka ITS rDNA, ki smo jih pridobili iz zbirke GenBank. Dolžina posameznih nukleotidnih zaporedij, ki smo jih vključili v analizo po poravnavi, je bila 644 bp. Izmed ofiostomatoidnih vrst, ki smo jih izolirali, sta dva taksona,

in sicer *Leptographium* sp.-1 in *Pesotum* sp.-1, najverjetneje še neopisani vrsti. V raziskavi smo s filogenetsko analizo jasno pokazali, da je skupina ofiostomatoidnih gliv polifiletična in vključuje različne filogenetske skupine. Ločili smo med vrstami iz reda Microascales in tistimi iz redu Ophiostomatales. Prav tako so bile jasno izražene različne filogenetske skupine znotraj reda Ophiostomatales, torej vrste *Grosmannia* z anamorfom iz rodu *Leptographium* ter vrste *Ophiostoma* z anamorfi iz rodov *Pesotum*, *Hyalorhinocladiella* in *Sporothrix*.

V drugem sklopu raziskave smo v letih 2008–2010 preučevali povezavo med podlubniki, bubami ter ličinkami podlubnikov in materinskih rogov podlubnikov v substratu ter asociacijskimi glivami, nabranimi na raziskovalnih ploskvah Boršt, Ig, Pugled, Vučja jama in Košenjak. Vse tri raziskovane vrste podlubnikov so bile v asociaciji z različnimi ofiostomatoidnimi glivami. 59,6 % pregledanih hroščev je imelo na sebi in v sebi glive, kar predstavlja 454 izolatov različnih ofiostomatoidnih gliv ter 136 izolatov drugih gliv (*Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Acremonium* sp., *Alternaria* sp., *Fusarium* spp.) in kvasovk. Na hroščih *P. chalcographus* so bile ofiostomatoidne glive zabeležene v 25 % primerov, na hroščih *I. typographus* jih je bilo 31,5 %, na hroščih *I. amitinus* pa 64,2 %. 90 % bub je imelo v asociaciji ofiostomatoidne glive, 62,5 % larv je bilo v asociaciji z ofiostomatoidnimi glivami, 50,6 % lesenih delcev pa je bilo okuženih z ofiostomatoidnimi glivami. Deset različnih vrst glivnih taksonov je bilo najdenih v asociaciji z *I. typographus*, osem s *P. chalcographus* in deset z *I. amitinus*. Noben izmed raziskovanih podlubnikov ni živel v asociaciji s samo eno specifično glivo. Našli pa smo razlike med tremi vrstami podlubnikov v vrstni sestavi gliv. Vrstna sestava gliv *P. chalcographus* in *I. typographus* se je razlikovala od vrstne sestave gliv *I. amitinus*. Pri raziskavi gliv v lesu ob napadu *I. amitinus* na višini debla 0,5 m od tal ni bilo močnega napada podlubnikov, prav tako na tej višini nismo izolirali veliko gliv. Z višino mesta vzorčenja na deblu od tal je naraščalo število izoliranih gliv. Znano je, da *I. amitinus* kolonizira tanjše dele dreves, zato ga najdemo više na deblu. Prav tako se je število gliv zmanjševalo z globino odvzetih vzorcev v lesu. Na sprednjem robu kolonizacije je bila gliva *C. polonica*, sledila ji je *G. penicillata* (do 19,3 milimetra globoko).

Tretji sklop raziskav je obsegal preučevanje patogenosti ofiostomatoidnih gliv, in sicer z inokulacijo gliv v gostiteljska drevesa na raziskovalni ploskvi v Litiji. Poskus smo izvajali od maja do oktobra 2012. Izbrane glive smo inokulirali v odrasla drevesa navadne smreke in smrekove sadike. Uporabili smo tako posamično kot množično inokulacijo. Patogenost ofiostomatoidnih gliv *C. polonica*, *O. bicolor*, *O. piceae*, *G. penicillata* in *G. piceiperda* je že bila raziskovana na nekaterih drugih območjih Evrope, medtem ko patogenost gliv *O. ainoae*, *O. brunneo-ciliatum*, *O. fuscum*, *G. cucullata* in *Leptographium* sp.-1 do sedaj še ni bila raziskana. Gostiteljsko drevo je vidno reagiralo na inokulacije z ofiostomatoidnimi glivami, sprožil se je obrambni mehanizem (smoljenje iz inokulacijskih točkah) in izzvan je bil odziv gostiteljskega drevesa na inokulacije (nekroze, odmiranje floema, obarvanje in izsušitev beljave). Odziv gostiteljskega drevesa je lahko sušenje (glive povzročajo odmiranje kambijalne cone drevesa ter prevodnih elementov v beljavi in ličju, podlubniki pa z dolbenjem rovov dodatno poškodujejo vitalna tkiva gostiteljskih dreves). Glive inducirajo obrambne mehanizme rastlin in tako pripomorejo k zmanjševanju kritične točke gostote napada podlubnikov, ki so že škodljivi za drevo.

Množična inokulacija odraslih dreves in inokulacija sadik z glivo *C. polonica* je sprožila nastanek vidnih simptomov na gostiteljskem drevesu, kot so nekroze okoli inokulacijskih točk, izsušena in obarvana beljava ter izločanje smole. Raziskava je pokazala, da je gliva *C. polonica* v zadostnih količinah (množična inokulacija) patogen in da je sposobna sprožiti sušenje zdravih odraslih dreves ali sadik navadne smreke.

Inokulaciji z drugimi glivami so sledili različni odzivi dreves. Izolati nekaterih gliv so pokazali določeno stopnjo patogenosti, npr. gliva *G. piceiperda* v inokulacijah odraslih dreves ali glive *Leptographium* sp.-1, *O. ainoae*, *G. penicillata* in *O. bicolor* v inokulacijah sadik. Nekateri izolati glive *G. piceiperda* so v inokulacijah odraslih dreves pokazali večjo patogenost od drugih, sprožila je razvoj značilno večjih nekroz. Vrste, ki povzročajo velike nekroze, vendar jim ne uspe prodreti globoko v beljavo, lahko z obročkanjem in razkrojem kambija ter prekinitevijo prevodnih tokov rastline v ksilemu in floemu prekinejo tok rudninskih snovi in hrani in tako poškodujejo ali povzročijo poškodbe ali sušenje gostiteljskega drevesa.

Glive in podlubniki živijo v medsebojni povezanosti – simbiozi (skupno življenje organizmov različnih vrst). Stalna asociacija ofiostomatoidnih gliv in podlubnikov kaže na to, da obstaja vzajemna korist obeh partnerjev. Tako ofiostomatoidne glive kot nekateri

podlubniki so v času skupnega življenja razvili morfološke prilagoditve drug na drugega – reproduktivni organi gliv so razviti tako, da se njihovi trosi enostavno prilepijo na vektorje, nekateri podlubniki pa so razvili mikangije za shranjevanje glivnih trosov. Korist ofiostomatoidnih gliv je prenos s podlubniki na novo gostiteljsko drevo. Podlubniki pa imajo od asociacije različne koristi – lahko se z glivami prehranjujejo (ksilomicetofagni hrošči) ali pa patogene glive pri drevesih spodbudijo obrambne mehanizme, zaradi česar drevesa začnejo odmirati in tako podlubnikom olajšajo kolonizacijo drevesa.

Pridobljena nova znanja o patogenosti nekaterih vrst ofiostomatoidnih gliv na navadni smreki, ki kot svoje vektorje uporabljajo ekonomsko najpomembnejše vrste srednjeevropskih podlubnikov, so lahko v pomoč pri strategijah integralnega varstva gozdov. Preventivne in profilaktične ukrepe moramo načrtovati tako, da zmanjšamo poškodbe smrekovih sestojev, pri čemer upoštevamo vlogo patogenih ofiostomatoidnih gliv, ki jih prenašajo podlubniki. Znanja o tritrofičnih interakcijah (gliva – podlubnik – drevo) so nova in pomembna pri gospodarjenju z gozdovi, saj njihova implikacija v nekaterih primerih lahko prepreči poškodbe sestojev ter poveča zdravje in kakovost gozda.

6.2 SUMMARY

The dissertation investigates and describes fungi associated with three bark beetle species: eight toothed spruce bark beetles (*Ips typographus* L.), six toothed spruce bark beetle (*Pityogenes chalcographus* L.) and small eight toothed spruce bark beetle (*Ips amitinus* Eichh.) in Slovenia. The research focuses on a group of fungi commonly known as ophiostomatoid fungi. This group is represented by several genera of Ascomycetes, which include *Ophiostoma* Syd. & P. Syd., *Ceratocystis* Ellis & Halst., *Ceratocystiopsis* H. P. Upadhyay & W. B. Kendr., *Grosmannia* Goid., as well as asexual forms *Leptographium* Lagerb. & Melin, *Pesotum* J. L. Crane & Schokn., *Sporothrix* Hektoen & C. F. Perkins, *Hyalorhinocladiella* H. P. Upadhyay & W. B. Kendr., *Thielaviopsis* Went, *Graphium* Corda.

Ophiostomatoid fungi, most frequently found in woody plants may be the cause of various diseases such as the staining of the sapwood (blue stain fungi) and vascular wilt diseases of the host tree. They are found on both coniferous and deciduous trees, most significantly on conifer trees of the northern hemisphere. The tritrophic beetle–fungus–tree interaction is important to an understanding of fungal biology.

Researches into ophiostomatoid fungi can be divided into three sections. The first section deals with the taxonomy and phylogeny of ophiostomatoid fungi. The second consists of research into the dependence of fungi on beetle species, beetle life stages or infested wood, and the third concerns the pathogenicity of the fungus to the host tree.

Associated fungi of three spruce bark beetles were investigated at 5 locations (Boršt, Ig, Pugled, Vučja jama, Košenjak) in 4 different phytogeographic regions of Slovenia (Alpsko, Dinarsko, Predinarsko, Subpanonsko) in years 2008–2010. Altogether, 624 specimens of *P. chalcographus*, *I. typographus*, and *I. amitinus* were obtained, 40 pupae, 40 larvae and 158 samples of bark beetles galleries of *I. amitinus*.

The fungi were identified based on the observed micro-morphological characteristics of their sexual and asexual structures. The following thirteen different taxa of ophiostomatoid fungi were assessed: *Ceratocystis polonica* (Siemaszko) C. Moreau, *Ceratocystiopsis minuta* (Siemaszko) H. P. Upadhyay & W. B. Kendr., *Graphium fimbriisporum* (M. Morelet) K. Jacobs, Kirisits & M. J. Wingf., *Grosmannia cucullata* (H. Solheim) Zipfel, Z. W. de Beer & M. J. Wingf., *Grosmannia penicillata* (Grosmann) Goid., *Grosmannia piceiperda* (Rumbold) Goid., *Leptographium* sp.-1, *Ophiostoma ainoae* H. Solheim, *Ophiostoma bicolor* R. W. Davidson & D. E. Wells, *Ophiostoma brunneo-ciliatum* Math.–Käärik, *Ophiostoma fuscum* Linnak., Z. W. de Beer & M. J. Wingf., *Ophiostoma piceae* (Münch) Syd. & P. Syd., and *Pesotum* sp.-1.

The most common species were: *O. bicolor*, *O. brunneo-ciliatum*, *O. ainoae*, *G. piceaperda*, *G. penicillata*, *Ceratocystiopsis minuta*, *O. piceae*, *G. cucullata*, *C. polonica*, *O. fuscum*, *G. fimbriisporum*, *Pesotum* sp.-1, *Leptographium* sp.-1.. In general, the isolated fungi represent species that are typical to the region and for spruce bark beetles. In the assemblage of ophiostomatoid fungi in Slovenia, we failed to find certain species which have been reported in other research conducted in similar ecological conditions. However

we found others including two taxa, that so far have not been identified: *Leptographium* sp.-1 and *Pesotum* sp.-1. Our study focused on the three most dangerous bark beetles colonizing the most economically important tree species in Slovenia, Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.), a wide variety of fungi were identified, suggesting a significant diversity of fungi in this part of Europe.

In the past, species of this group were based on morphological and ecological characters classified into the same genus. Genera in ophiostomatoid fungi group are morphologically similar but, since determination with only morphological techniques is not always reliable, due to the overlapping characters, it is necessary to use molecular methods for further validation. The most commonly used method is identification of fungal species with specific DNA (deoxyribonucleic acid) "target sequences". These methods are also useful for the determination of the evolutionary relationships between taxa.

Altogether, 71 isolates were included in the molecular studies whose aim was confirmation of the species identification resulting from the morphological examinations. Isolates representing different putative species, based on their morphology, were grown in a liquid malt extract medium. DNA was extracted from the isolates using the 2% (wt/vol) hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) protocol, followed by the method of PCR (polymerase chain reaction) using ITS (internal transcribed spacer) rDNA primers. Sequencing of the PCR products was performed to determine the DNA sequences. This study provided 21 rDNA sequences which were aligned with selected sequences from GenBank using the ClustalW program. Phylogenetic relationships were inferred by the neighbour-joining (NJ) method using MEGA 5. The groupings of the fungal entities based on their morphology were fully consistent with groupings based on their ITS rDNA sequences. The phylogenetic placement of the isolates collected during this investigation, as well as those of the reference sequences obtained from GenBank were grouped together in monophyletic clades. Among ophiostomatoid species that were isolated, two taxons, *Leptographium* sp.-1 and *Pesotum* sp.-1, probably represent unidentified species.

In this phylogenetic analysis it was clearly demonstrated that the group of ophiostomatoid fungi is polyphyletic and includes different phylogenetic clades. We separated species from the orders Microascales and Ophiostomatales. Also clearly expressed were different phylogenetic groups within Ophiostomatales, *Grosmannia* species with *Leptographium*

anamorph and *Ophiostoma* species with *Pesotum*, *Hyalorhinocladiella* and *Sporothrix* anamorph.

In the second part of the study we investigated the relationship between bark beetles and associated fungi in the years 2008–2010 on the study areas Boršt, Ig, Pugled, Vučja jama, Košenjak. All the species of bark beetles studied were found to be associated with various ophiostomatoid fungi. Fungi were isolated from 59.6% of the examined beetles, resulting in 454 strains of various ophiostomatoid fungi and 136 strains of other fungi (most commonly *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Acremonium* sp., *Alternaria* sp., and *Fusarium* sp.) as well as yeasts. Ophiostomatoid fungi were isolated from 40.0% of the investigated beetles. *I. amitinus* was the species associated with the highest frequency of appearance of all the fungi species followed by *I. typographus* and *P. chalcographus* (75.5%, 65.5%, and 37.8% respectively). Some 90% of the pupae were associated with ophiostomatoid fungi; 62.5% of larvae were associated with ophiostomatoid fungi and 50.6% of wood fragments were infected with ophiostomatoid fungi. 10 different fungal taxa were found in associations with *I. typographus*, 8 with *P. chalcographus* and 10 with *I. amitinus*. None of the bark beetles studied lived in association with only one fungal species. Differences in species composition of fungi between the three bark beetles were found. For example, species composition of *P. chalcographus* and *I. typographus*–associated fungi differed from that of *I. amitinus*–associated fungi.

During the *I. amitinus* colonization of *P. abies*, few bark beetles were found on the trunk below 0.5 meters from the ground. At this height there were also not many isolated fungi but the number of isolated fungi increased with the sampling height on the trunk. It is known that *I. amitinus* colonize the thinner parts of the tree, and therefore fungi are found higher up in the trunk. The number of fungi decreased with the depth at which the samples were taken. On the front edge of the colonization was *C. polonica*, followed by *G. penicillata* (up to 19.3 mm in depth).

The third section of this research was a study of the pathogenicity of ophiostomatoid fungi, obtained through fungi inoculations in the host tree. The research was conducted in the Litija study area from May to October 2010. Inoculations were performed in mature trees and seedlings and we used both the small and large quantities of fungi inoculum.

Pathogenicity of the fungus *C. polonica*, *Ophiostoma bicolor*, *O. piceae*, *G. penicillata* and *G. piceiperda* has already been studied in some other parts of Europe, but the pathogenicity of *O. ainoae*, *O. brunneo-ciliatum*, *O. fuscum*, *G. cucullata* and *Leptographium* sp.-1 has so far been unexplored.

The host tree visibly reacted to inoculation with ophiostomatoid fungi. The defense mechanisms of trees, such as sap flow from the inoculation points, were initiated and secondly, the induced responses of the host tree, lesions, phloem necrosis, staining and drying out of the sapwood were initiated. This is dangerous for the tree, and shows that fungi associated with the bark beetle are an additional cause of tree death. The fungi infect the vascular system of a tree, causing interruption of water and nutrients transport which results in the death of the tree. Fungi that trigger the defense mechanisms of trees help reduce the critical point of bark beetle attack density.

Mass inoculations of adult trees and seedlings inoculations with *C. polonica* initiates the development of visible symptoms on the host tree, such as necrosis around the inoculation points, desiccated and colored sapwood, and resin outflow. Research has shown that *C. polonica*, when inoculated in sufficient quantities, is a pathogen capable of initiating the death of healthy adult trees or seedlings.

Inoculations with other fungi led to different tree responses. Isolates of some fungi, for example *G. piceiperda* in the inoculations of mature trees or *Leptographium* sp.-1, *O. ainoae*, *G. penicillata*, *O. bicolor* in the inoculations of seedlings have shown a certain degree of pathogenicity. Some isolates of *G. piceiperda*, inoculated into adult trees showed higher pathogenicity than others and initiated the development of significantly larger lesions. The species that cause significant lesions, but fail to penetrate deep into the sapwood, can nevertheless severely damage the host tree with girdling of the phloem.

The continuing association of ophiostomatoid fungi and bark beetles suggest that there is a mutual benefit to the both partners. Both ophiostomatoid fungi and bark beetles have developed some kind of physical adaptation to one another during their life together (fruiting bodies of fungi are developed so that the spores can be easily adhered to the beetle vectors and some bark beetles have developed mycangia to carry fungal spores). Fungi may benefit from the association by vectoring to the new host tree. Bark beetle may benefit from the association by feeding on the fungi (ambrosia beetles), or by pathogenic fungi

contributing to the death of host tree with stimulation of trees defense mechanisms, which facilitates the bark beetles colonization of host tree.

Gained knowledge about the pathogenicity of certain species of ophiostomatoid fungi in association with the most economically significant species of spruce bark beetles in Slovenia may be implemented in the work of reporting, diagnostic and prognostic service for Slovenian forests. Preventive and prophylactic measures should be designed so as to minimize damage to spruce stands, taking into account the important role of pathogenic ophiostomatoid fungi transmitted by bark beetles. Knowledge about three-trophic interactions (fungus–bark beetle–tree) is new and extremely important in forest management, because their implications may in some cases prevent damage to stands and increase the health and quality of forests.

7 VIRI

- Agrios, G. N. 1988. Plant pathology. San Diego, Academic Press: 803 str.
- Anderson, M. J. 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology*, 26: 32–46
- Babuder, G., Pohleven, F. 1993. Simbiotske glive progastega lestvičarja *Xyloterus lineatus* (Coleoptera, Scolytidae) (Symbiotic fungi of the striped bark beetle *Xyloterus lineatus*). *Zbornik gozdarstva in lesarstva*, 41: 99–110
- Babuder, G., Pohleven, F. 1995. Sukcesivno pojavljanje gliv v rovih ambrozija hroščev v hrastovem lesu (*Quercus*). *Zbornik gozdarstva in lesarstva*, 47: 241–254
- Baier, P., Führer, E., Kirisits, T., Rosner, S. 2002. Defence reactions of Norway spruce against bark beetles and the associated fungus *Ceratocystis polonica* in secondary pure and mixed species stands. *Forest Ecology and Management*, 159: 73–86
- Baldauf, S. L. 2003. Phylogeny for the faint of heart: a tutorial. *Trends in Genetics*, 19, 6: 345–351
- Baxevanis, A. D., Ouellette, B. F. F. 2001. Bioinformatics: a practical guide to the analysis of genes and proteins. New Jersey, John Wiley and Sons: 470 str.
- Beaver, R. A. 1989. Insect-fungus relationships in the bark and ambrosia beetles. V: Insect-Fungus Interactions. Wildong, N., Collins, N. M., Hammond, P. M., Webber, J. F. (ur.). London, Academic Press: 121–143
- Benade, E., Wingfield, M. J., Wyk, P. S. van 1995. Conidium development in the *Hyalorhinocladiella* anamorph of *Ophiostoma ips*. *Mycologia*, 87, 3: 298–303
- Benjamin, R. K., Blackwell, M., Chapela, I. H., Humber, R. A., Jones, K. G., Klepzig, K. D., Lichtwardt, R. W., Malloch, D., Spatafora, J. W., Weir, A., Mueller, G. M., Bills, G. F., Foster, M. S. 2004. Insect– and other arthropod–associated fungi. Burlington, MA, Elsevier Academic Press: 395–434
- BLAST Assembled RefSeq Genomes (5. 1. 2012)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> (5. 1. 2012)
- Bridge, P., Spooner, B. 2001. Soil fungi: diversity and detection. *Plant and Soil*, 232: 147–154
- Brown, T. A. 2002. Genomes. Oxford, VB, BIOS Scientific Publisher: 520 str.

- Bruns, T. D., Fogel, R., Taylor, J. W. 1990. Amplification and sequencing of DNA from fungal herbarium specimens. *Mycologia*, 82, 2: 175–184
- Christiansen, E. 1985. *Ceratocysts polonica* inoculated in Norway spruce: blue-staining in relation to inoculum density, resinosis and tree growth. *European Journal of Forest Pathology*, 15, 3: 160–167
- Christiansen, E., Krokene, P., Berryman, A. A., Franceschi, V. R., Krekling, T., Lieutier, F., Lönneborg, A., Solheim, H. 1999. Mechanical injury and fungal infection induce acquired resistance in Norway spruce. *Tree Physiology*, 19: 399–403
- Christiansen, E., Warning, R. H., Berryman, A. A. 1987. Resistance of conifers to bark beetle attack: searching for general relationships. *Forest Ecology and Management*, 22, 1–2: 89–106
- Farrell, B. D., Sequeira, A. S., O'Meara, B. C., Normark, B. B., Chung, J. H., Jordal, B. H. 2001. The evolution of agriculture in beetles (Curculionidae: Scolytinae and Platypodinae). *Evolution*, 55, 10: 2011–2027
- Felstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 4: 783–791
- Franceschi, V. R., Krokene, P., Krekling, T., Christiansen, E. 2000. Phloem parenchyma cells are involved in local and distant defense responses to fungal inoculation or bark-beetle attack in Norway spruce (Pinaceae). *American Journal of Botany*, 87, 3: 314–326
- Friedl, K. 2004. Bläue an Fichtenrundholz-Schadensquantifizierung und Auswirkung auf die Lagerungsdauer. 37. V: Internationales Symposium: Mechanisierung der Waldarbeit, 8. – 10. September 2004, Gmunden: 1-8 str.
http://formec.boku.ac.at/images/proceedings/2004/PA_Friedl.pdf (7. 5. 2010)
- Furniss, M. M., Solheim, H., Christiansen, E. 1990. Transmission of blue-stain fungi by *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytidae) in Norway spruce. *Annals of the Entomological Society of America*, 90: 712–716
- Gardes, M., Bruns, T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes—application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2: 113–118
- Gibbs, J. N., Wingfield, M. J., Seifert, K. A., Webber, J. F. 1993. The biology of ophiostomatoid fungi causing sapstain in trees and freshly cut logs. V: *Ceratocystis*

- and *Ophiostoma*: Taxonomy, Ecology, and Pathogenicity. Wingfield, M. J., Seifert, K. A., Webber, J. F. (ur.). St. Paul, American Phytopathological Society: 153–160
- Gril, T. 2009. Karakterizacija genetske variabilnosti izolatov glive *Monilinia laxa* (Aderh. & Ruhland) Honey in razvoj diagnostičnih markerjev. Doktorska disertacija, Ljubljana, Univerza v Ljubljani: 142 str.
- Grüne, S. 1979. Handbuch zur Bestimmung der Europäischen Borkenkäfer. Hannover, Verlag M. & H. Schaper: 182 str.
- Grylls, B. T., Seifert, K. A. 1993. A synoptic key to species of *Ophiostoma*, *Ceratocystis* and *Ceratocystiopsis*. V: *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: Taxonomy, Ecology, and Pathogenicity. Wingfield, M. J., Seifert, K. A., Webber, J. F. (ur.). St. Paul, American Phytopathological Society: 261–268.
- Guarro, J., Gené, J., Stchigel, A. M. 1999. Developments in fungal taxonomy. Clinical Microbiology Reviews, 12, 3: 454–500
- Haberkern, K. E., Illman, B. L., Raffa, K. F. 2002. Bark beetles and fungal associates colonizing white spruce in the great lakes region. Canadian Journal of Forest Research, 32: 1137–1150
- Harrington, T. C. 1992. *Leptographium*. V: Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi. Singleton, L. L., Mihail, J. D., Rush, C. M. (ur.). St. Paul, American Phytopathological Society: 129–133
- Harrington, T. C. 1993. Diseases of conifers caused by species of *Ophiostoma* and *Leptographium*. V: *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: Taxonomy, Ecology, and Pathogenicity. Wingfield, M. J., Seifert, K. A., Webber, J. F. (ur.). St. Paul, American Phytopathological Society: 161–172
- Harrington, T. C. 2005. Ecology and evolution of mycophagous bark beetles and their fungal partners. V: Insect–Fungal Association Ecology and Evolution. Vega, F. E., Blackwell, M. (ur.). New York, Oxford University Press: 257–291
- Harrington, T. C., Wingfield, M. J. 1998. The *Ceratocystis* species on conifers. Canadian Journal of Botany, 76: 1446–1457
- Hausner, G., Reid, J., Klassen, G. R. 1993. Grouping of isolates and species of *Ceratocystis* sensu lato on the basis of molecular and morphological characters. V: *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: Taxonomy, Ecology, and Pathogenicity. Wingfield, M. J., Seifert, K. A., Webber, J. F. (ur.). St. Paul, American Phytopathological Society: 93–104

- Holm, S. 1979. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics*, 6: 65–70
- Horntvedt, R., Christiansen, E., Solheim, H., Wang, S. 1983. Artificial inoculation with *Ips typographus*-associated blue-stain fungi can kill healthy Norway spruce trees. *Meddelelser fra det Norsk Institutt for Skogforskning*, 38, 4: 1–20
- Hudgins, J. W., Franceschi, V. R. 2004. Methyl jasmonate-induced ethylene production is responsible for conifer phloem defense responses and reprogramming of stem cambial zone for traumatic resin duct formation. *Plant Physiology*, 135: 2134–2149
- Index fungorum (21. 7. 2014)
<http://www.indexfungorum.org> (21. 7. 2014)
- Innis, M. A., Gelfand, D. H. 1990. Optimization of PCRs. V: PCR protocols: a guide to Methods and Applications. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. (ur.). Academic Press: 3–12
- Jacobs, K., Wingfield, M. J. 2001. *Leptographium* species: Tree pathogens, insect associates, and agents of blue-stain. St. Paul, American Phytopathological Society: 224 str.
- Jankowiak, R. 2005. Fungi associated with *Ips typographus* on *Picea abies* in southern Poland and their succession into the phloem and sapwood of beetle-infested trees and logs. *Forest Pathology*, 35: 37–55
- Jankowiak, R. 2006a. Fungi associated with *Tomicus piniperda* in Poland and assessment of their virulence using Scots pine seedlings. *Annals of Forest Science*, 63: 801–808
- Jankowiak, R. 2006b. Mycobiota associated with *Hylurgops palliatus* (Gyll.) on *Pinus sylvestris* in Poland. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 75, 4: 333–338
- Jankowiak, R., Hilszczański, J. 2005. Ophiostomatoid fungi associated with *Ips typographus* (L.) on *Picea abies* [(L.) H. Karst.] and *Pinus sylvestris* L. In north-eastern Poland. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 74, 4: 345–350
- Jankowiak, R., Kacprzyk, M., Mlynarczyk, M. 2009. Diversity of ophiostomatoid fungi associated with bark beetles (Coleoptera: Scolytidae) colonizing branches of Norway spruce (*Picea abies*) in southern Poland. *Biologia*, 64, 6: 1170–1177

- Jankowiak, R., Kolařík, M. 2010. Diversity and pathogenicity of ophiostomatoid fungi associated with *Tetropium* species colonizing *Picea abies* in Poland. *Folia Microbiologica*, 55, 2: 145–154
- Jurc, M. 1997. Patogeni-simbionti-endofiti: sinonimi ali samostojne kategorije organizmov. V: Izvlečki referatov na 3. slovenskem posvetovanju o varstvu rastlin. Ljubljana: Društvo za varstvo rastlin Slovenije, 1997: 26–27
- Jurc, M. 2005. Fungi associated with bark beetles (*Coleoptera: Scolytidae*) on Norway spruce in Slovenia. V: Forest in the Balance: Linking Tradition and Technology. Innes, J. L., Edward, I. K., Swilford, D. J. (ur.). XXII IUFRO World Congress, Brisbane, Australia, 8.–13. 8. 2005. International Forestry Review 5, 7: 81–82
- Jurc, M. 2011. Gozdna zoologija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire: 348 str.
- Jurc, M., Bojović, S. 2004. Bark beetle outbreaks during the last decade with special regard to the eight-toothed bark beetle (*Ips amitinus* Eichh.) outbreak in the Alpine region of Slovenia. V: Biotic damage in forests. Csóka, G. (ur.). Mátrafüred, Hungarian forest research institute: 85–95
- Kajfež Bogataj, L. 2009. Climate change and future adaptation. Economic and business review, 11, 1: 9–27
- Kamataa, N., Esakia, K., Katoa, K., Igetaa, Y., Wadaa, K. 2002. Potential impact of global warming on deciduous oak dieback caused by ambrosia fungus *Raffaelea* sp. carried by ambrosia beetle *Platypus quercivorus* (*Coleoptera: Platypodidae*) in Japan. Bulletin of Entomological Research, 92: 119–126
- Kang, H. W., Cho, Y. G., Yoon, U. H., Eun, M. Y. 1998. A rapid DNA extraction method for RFLP and PCR analysis from a single dry seed. Plant Molecular Biology Reporter, 16, 1: 90
- Karte razširjenosti (8. 8. 2014)
http://www.zdravgozd.si/bi_index.aspx (8. 8. 2014)
- Kauserud, H., Heegaard, E., Semenov, M. A., Boddy, L., Halvorsen, R., Stige, L. C., Sparks, T. H., Gange, A. C., Stenseth, N. C. 2009. Climate change and spring-fruiting fungi. Proceedings of the Royal Society B, 277, 1685: 1169–1177
- Kendrick, B. 2003. The fifth kingdom: all about fungi. Newburyport (MA), Mycologue publications: 373 str.

- Kim, S. H., Uzunovic, A., Breuil, C. 1999. Rapid detection of *Ophiostoma piceae* and *O. quercus* in stained wood by PCR. Applied and Environmental Microbiology, 65, 1: 287–290
- Kirisits, T. 1998. Pathogenicity of three blue-stain fungi associated with the bark beetle *Ips typographus* to Norway spruce in Austria. Österreichische Zeitschrift für Pilzkunde, 7: 191–201
- Kirisits, T. 2004. Fungal associates of European bark beetles with special emphasis on the ophiostomatoid fungi. V: Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, A Synthesis. Lieutier, F. (ur.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 181 – 235
- Kirisits, T. 2009. Fungi isolated from *Picea abies* infested by the bark beetle *Ips typographus* in the Białowieża forest in nort–east Poland. Forest Pathology, 40, 2: 100–110
- Kirisits, T. 2013. Dutch elm disease and other ophiostoma diseases. V: Infectious Forest Diseases. Gonthier, P., Nicolotti, G. (ur.). Oxfordshire, UK, CAB International: 256–283
- Kirisits, T., Grubelik, R., Führer, E., Müller, F. 2000. Die ökologische bedeutung von Bläuepilzen für Rindenbrütende Borkenkäfer. (The ecological role of blue-stain fungi for phloem-feeding bark beetles.). Wien, Schriftenreihe der Forstlichen Bundesversuchsanstalt = Vienna, FBVA–Berichte: 117–137
- Kirisits, T., Offenthaler, I. 2002. Xylem sap flow of Norway spruce after inoculation with the blue–stain fungus *Ceratocystis polonica*. Plant Pathology, 51: 359–364
- Kirisits, T., Wingfield, M. J., Führer, E. 1998. Comparative studies on the association of the bark beetles *Ips typographus*, *Ips cembrae* and *Ips amitinus* with blue–stain fungi in Central Europe. V: Proceedings of the Sixth European Congress of Entomology. 23.–29.8. 1998. Brunnhofer V., Soldan T. (ur.). České Budějovice: 322 str.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter, D. W. Stalpers, J. A., Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter, D. W., Stalpers, J. A. 2008. Dictionary of the fungi. Wallingford, CABI Publishing: 640 str.
- Klepzig, K. D., Moser, J. C., Lombarder, F. J., Hofstetter, R. W., Ayres, M. P. 2001. Symbiosis and competition: Complex interactions among beetles, fungi and mites. Symbiosis, 30: 83–96

- Knogge, W. 1998. Fungal pathogenicity. Current Opinion in Plant Biology, 1: 324–328
- Komel, R. 2006. Genetika od dvojne vijačnice do kloniranja. Ljubljana, Rokus: 127 str.
- Košir, B., Krč, J. 2007. Pridobivanje lesa in organizacija gozdarskih del po ujmah. V. Podnebne spremembe – vpliv na gozd in gozdarstvo. Studia forestalia Slovenica, 130. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire: 269–287.
- Krokene, P., Fossdal, C. G. 2006. Conifer defense against infection by *Ophiostoma* and *Ceratocystis*. V: The Ophiostomatoid Fungi: expanding Frontiers, Brisbane, Australia, 16.–18. 8. 2006. Seifert, K. A., de Beer Z. W., Wingfield M. J. (ur.). CBS Biodiversity, 12: 141–151
- Krokene, P., Solheim, H. 1996. Fungal associates of five bark beetle species colonizing Norway spruce. Canadian Journal of Forest Research, 26: 2115–2122
- Krokene, P., Solheim, H. 1998a. Assessing the virulence of four bark beetle-associated bluestain fungi using Norway spruce seedlings. Plant Pathology, 47, 4: 537–540
- Krokene, P., Solheim, H. 1998b. Pathogenicity of four blue-stain fungi associated with aggressive and nonaggressive bark beetles. Phytopathology, 88: 39–44
- Krokene, P., Solheim, H., Lieutier, F., Mattson, W. J., Wagner, M. R. 1999. What do low-density inoculations with fungus tell us about fungal pathogenicity and tree resistance? V: Physiology and genetics of tree-phytophage interactions, Les Colloques de l'INRA: 353–362
- Kump, B., Rogl, S., Javornik, B. 1992. Izolacija visokomolekularne DNK iz rastlinskih tkiv. Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Kmetijstvo, 59: 63–66
- Lah, L., Hsiang, T., Breuil, C., Bohlmann, J., Komel, R. 2013. Comparative genomics of *Ceratocystis polonica* and *Ophiostoma bicolor*, two bark beetle-associated pathogenic fungi. V: 27th Fungal genetics conference, Asilomar, Kalifornija, 12.–17. marec 2013, Fungal Genetics Reports, 60: str. 191
- Lee, S. 2006. Fungi associated with the mountain pine beetle, *Dendroctonus ponderosae*. Vancouver, The University of British Columbia: 152 str.
- Linnakoski, R. 2011. Bark beetle-associated fungi in fennoscandia with special emphasis on species *Ophiostoma* and *Grosmannia*. Joensuu, University of Easteren Finland: 74 str.

- Linnakoski, R., Beer, Z. W. de, Ahtiainen, J., Sidorov, E., Niemelä, P., Pappinen, A., Wingfield, M. J. 2010. *Ophiostoma* spp. associated with pine- and spruce-infesting bark beetles in Finland and Russia. *Persoonia*, 25: 72–93
- Linnakoski, R., Beer, Z. W. de, Duong, T. A., Niemela, P., Pappinen, A., Wingfield, M. J. 2012a. *Grosmannia* and *Leptographium* spp. Associated with conifer-infesting bark beetles in Finland including *Leptographium taigense* sp. nov. Antonie van Leeuwenhoek, 102: 375–399
- Linnakoski, R., Beer, Z. W. de, Niemelä, P., Wingfield, M. J. 2012b. Associations of conifer–infesting bark beetles and fungi in Fennoscandia. *Insects*, 3, 1: 200–227
- Linnakoski, R., Beer, Z. W. de, Rousi, M., Niemela, P., Pappinen, A., Wingfield, M. J. 2008. Fungi, including *Ophiostoma karelicurm* sp. Nov., associated with *Scolytus ratzeburgi* infesting birch in Finland and Russia. *Mycological Research*, 112: 1475–1488
- Maček, J. 2008. Gozdna fitopatologija. Ljubljana, Zavod za gozdove Slovenije, Zveza gozdarskih društev Slovenije. Gozdarska založba: 448 str.
- MAFFT (5. 1. 2012)
<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html> (5. 1. 2012)
- Malloch, D., Blackwell, M. 1993. Dispersal biology of the ophiostomatoid fungi. V: *Ceratocystis and Ophiostoma: Taxonomy, Ecology, and Pathogenicity*. Wingfield, M. J., Seifert, K. A., Webber, J. F. (ur.). St. Paul, American Phytopathological Society: 195–206
- Marin, M., Preisig, O., Wingfield, B. D., Kirisits, T., Wingfield, M. J. 2009. Single sequence repeat markers reflect diversity and geographic barriers in Eurasian populations of the conifer pathogen *Ceratocystis polonica*. *Forest Pathology*, 39, 4: 249–265
- Martin, M. M. 1992. The evolution of insect–fungus associations: From contact to stable symbiosis. *American Zoologist*, 32: 593–605
- Martín, M. P. 2000. DNA based methods for identification of ectomycorrhizae. V: Methods in root–soil interactions research protocols. Tehnical Workshop of the COST asction E6 Eurosilva, Gozd Martuljek, Slovenia 8. 9. 2000. Martín, M. P. (ur.). Ljubljana, Slovenian forestry institute: 29–44

- Matusick, G. 2010. Pathogenicity and virulence of root-inhabiting ophiostomatoid fungi on *Pinus* species of the southeastern United States. Auburn, Alabama, Auburn University: 196 str.
- Nkuekam, G. K., Beer, Z. W. de, Wingfield, M. J., Roux, J. 2012. A diverse assemblage of *Ophiostoma* species, including two new taxa on Eucalypt trees in South Africa. *Mycological Progress*, 11: 515–533
- Nkuekam, G. K. 2007. *Ceratocystis* and *Ophiostoma* species infecting wounds on hardwood trees, with particular reference to South Africa. Pretoria, University of Pretoria: 178 str.
- Novotny, D., Jankovsky, L. 2005. Notes on mycobiota associated with *Ips typographus* from the Šumava Mts. (Czech Republic). *Czech Mycology*, 57, 1–2: 91–96
- Okada, G., Seifert, K. A., Takematsu, A., Yamaoka, Y., Miyazaki, S., Tubaki, K. 1998. A molecular phylogenetic reappraisal of the *Graphium* complex based on 18S rDNA sequences. *Canadian Journal of Botany*, 74: 1495–1506
- Okland, B., Skarpaas, O. 2008. Draft pest risk assessment report on the small spruce bark bark beetle, *Ips amitinus*. Ås, Norwegian Forest and Landscape Institute, 24 str.
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Wagner, H. 2011. Vegan community ecology package. R package.
<http://CRAN.R-project.org/package=vegan> (4. 4. 2012)
- Paine, T. D., Raffa, K. F., Harrington, T. C. 1997. Interactions among scolytid bark beetles, their associated fungi, and live host conifers. *Annual Review of Entomology*, 42: 176–206
- Paracer, S., Ahmadjian, V. 2000. Symbiosis: An introduction to biological associations. University of Oxford, Oxford University Press, 291 str.
- Pfeffer, A. 1995. Zentral- und Westpaläarktische Borken- und Kernkäfer (Coleoptera: Scolytidae, Platypodidae). Basel, Pro entomologia c/o Naturhistorisches Museum Basel, 310 str.
- 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

- Raffa, K. F., Klepzig, K. D. 1992. Tree defense mechanisms against fungi associated with insects. V: Defense Mechanisms of Woody Plants Against Fungi. Blanchette, R., Biggs, A. (ur.). Springer: 354–390
- Ralph, S. G., Yueh, H., Friedmann, M., Aeschliman, D., Zeznik, J. A., Nelson, C. C., Butterfield, Y. S. N., Kirkpatrick, R., Liu, J., Jones, S. J. M., Marra, M. A., Douglas, C. J., Ritland, K., Bohlmann, J. 2006. Conifer defence against insects: Microarray gene expression profiling of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) induced by mechanical wounding or feeding by spruce budworms (*Choristoneura occidentalis*) or white pine weevils (*Pissodes strobi*) reveals large-scale changes of the host transcriptome. *Plant Cell and Environment*, 29, 8: 1545–1570
- Reid, R. W., Whitney, H. S., Watson, J. A. 1967. Reactions of lodgepole pine to attack by *Dendroctonus ponderosae* Hopkins and blue stain fungi. *Canadian Journal of Botany*, 45: 1115–1126
- Repe, A., Borković, D., Jurc, M. 2014. Povezava med podlubniki in glivami modrivkami na iglavcih. Predavanje na 5. seminarju in delavnici iz varstva gozdov, Mašun, 19. 6. 2014.
- Repe, A., Jurc, M. 2009. Ophiostomatoidne gljive na potkornjacima u Sloveniji. V: Glasilo biljne zaštite. 53. seminar biljne zaštite, Opatija, Hrvaška, 9, 1–2: 39–40
- Repe, A., Jurc, M. 2010. Ophiostomatoid fungi (*Ascomycota: Ophiostomataceae*) associated with bark beetles and their possible economic impact in forests and timber production. *Zbornik gozdarstva in lesarstva*, 91: 3–12
- Repe, A., Jurc, M. 2012. Glive modrivke in njihov pomen za gozdarstvo. 3. seminar in delavnica iz varstva gozdov, Štore pri Sežani, 21. 6. 2012.
- Repe, A., Kirisits, T., Piškur, B., Groot, M. de, Kump, B., Jurc, M. 2013. Ophiostomatoid fungi associated with three spruce-infesting bark beetles in Slovenia. *Annals of Forest Science*, 70, 7: 717–727
- Rice, A. V., Thormann, M. N., Langor, D. W. 2007. Virulence of, and interactions among, mountain pine beetle associated blue-stain fungi on two pine species and their hybrids in Alberta. *Canadian Journal of Botany*, 85: 316–323
- Rivera, F. N., Gómez, Z., González, E., López, N., Rodríguez, C. H. H., Zúniga, G. 2007. Yeasts associated with bark beetles of the genus *Dendroctonus erichson*

- (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae): Molecular identification and biochemical characterization. USDA Forest Service Proceedings RMRS: 45–47
- Rogers, S. O., Bendich, A. J. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. Plant Molecular Biology, 5, 2: 69–76
- Ryan, J. A. 1960. Significance test for multiple comparison of proportions, variances and other statistics. Psychological Bulletin, 57: 318–328
- Saitou, N., Nei, M. 1987. The Neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution, 4, 4: 406–425
- Sallé, A., Monclus, R., Yart, A., Garcia, J., Romary, P., Lieutier, F. 2005. Fungal flora associated with *Ips typographus*: Frequency, virulence, and ability to stimulate the host defence reaction in relation to insect population levels. Canadian Journal of Forest Research, 35: 365–373
- Samuels, G. J. 1993. The case for distinguishing ceratocystis and ophiostoma. V: *Ceratocystis and Ophiostoma: Taxonomy, Ecology, and Pathogenicity*. Wingfield, M. J., Seifert, K. A., Webber, J. F. (ur.). St. Paul, American Phytopathological Society: 15–20.
- Schroeder, S., Kim, S. H., Cheung, W. T., Sterflinger, K., Breuil, C. 2001. Phylogenetic relationship of *Ophiostoma piliferum* to other sapstain fungi based on the nuclear rRNA gene. FEMS Microbiology Letters, 195: 163–167
- Seifert, K. A. 1993. Sapstain of commercial lumber by species of ophiostoma and ceratocystis. V: *Ceratocystis and Ophiostoma: Taxonomy, Ecology, and Pathogenicity*. Wingfield, M. J., Seifert, K. A., Webber, J. F. (ur.). St. Paul, American Phytopathological Society: 141–151
- Seifert, K. A., Beer, Z. W. de, Wingfield, M. J. 2006. Ophiostomatoid fungi: Expanding frontiers. Brisbane, Australia, CBS Biodiversity, 12: 323 str.
- Shaner, G., Stromberg, E. L., Lacy, G. H., Barker, K. R., Pirone, T. P. 1992. Nomenclature and concepts of pathogenicity and virulence. Annual Review of Phytopathology, 30: 47–66
- Shigo, A. L., Marx, H. 1977. Compartmentalization of decay in trees. (CODIT). U.S. Department of Agriculture. Forest Service Agriculture Information Bulletin, 405: 73 str.

- Six, D. L. 2003. Bark beetle–fungus symbioses. V: Insect Symbiosis. Bourtzis, K., Miller, T. A. (ur.). CRC Press LLC: 97–114
- Six, D. L. 2012. Ecological and evolutionary determinants of bark beetle–fungus symbioses. *Insects*, 3 339–366
- Six, D. L., Wingfield, M. J. 2011. The role of phytopathogenicity in bark beetle–fungus symbioses: A challenge to the classic paradigm. *Annual Review of Entomology*, 56: 255–272
- Solheim, H. 1986. Species of Ophiostomataceae isolated from *Picea abies* infested by the bark beetle *Ips typographus*. *Nordic Journal of Botany*, 6, 2: 199–207
- Solheim, H. 1988. Pathogenicity of *Ips typographus*–associated blue-stain fungi to Norway spruce. *Meddelelser fra Norsk Institutt for Skogforskning*, 40,14: 1–11.
- Solheim, H. 1992a. The early stages of fungal invasion in Norway spruce infested by the bark beetle *Ips typographus*. *Canadian Journal of Botany*, 70: 1–5
- Solheim, H. 1992b. Fungal succession in sapwood of Norway spruce infested by the bark beetle *Ips typographus*. *European Journal of Forest Pathology*, 22: 136–148
- Solheim, H. 1993. Ecological aspect of fungi associated with the spruce bark beetle *Ips typographus* in Norway. V: *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: Taxonomy, Ecology, and Pathogenicity. Wingfield, M. J., Seifert, K. A., Webber, J. F. (ur.). St. Paul, American Phytopathological Society: 235–242
- Taiz, L., Zeiger, E. 2006. Plant physiology. Sunderland (Mass.), Sinauer Associates: 764 str.
- 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, 10: 2731–2739
- Tarman, K. 1992. Osnove ekologije in ekologija živali. Ljubljana, DZS: 547 str.
- Taylor, J. W. 2011. One Fungus = One Name: DNA and fungal nomenclature twenty years after PCR. *IMA Fungus*, 2, 2: 113–120
- Torelli, N., Leban, I., Zupančič, M. 1988. CODIT pri bukvi. *Les*, 40, 3/4: 73–74
- Upadhyay, H. P. 1981. A monograph of *Ceratocystis* and *Ceratocystiopsis*. Athens, University of Georgia Press: 176 str.

- Upadhyay, H. P. 1993. Classification of the ophiostomatoid fungi. V: *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: Taxonomy, Ecology, and Pathogenicity. Wingfield, M. J., Seifert, K. A., Webber, J. F. (ur.). St. Paul, American Phytopathological Society: 7–14.
- Vek, V. 2013. Ekstraktivi v poškodovanem lesu in grčah navadne bukve (*Fagus sylvatica* L.): doktorska disertacija. (Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta). Ljubljana, samozal.: 162 str.
- Viiri, H. 1997. Fungal associates of the spruce bark beetle *Ips typographus* L. (Col. Scolytidae) in relation to different trapping methods. Journal of Applied Entomology, 121, 9–10: 529–533
- Viiri, H., Annila, E., Kitunen, V., Niemelä, P. 2001. Induced responses in stilbenes and terpenes in fertilized Norway spruce after inoculation with blue-stain fungus, *Ceratocystis polonica*. Trees, 15: 112–122
- Viiri, H., Lieutier, F. 2004. Ophiostomatoid fungi associated with the spruce bark beetle *Ips typographus*, in three areas in France. Annals of Forest Science, 61: 215–219
- Villari, C., Tomlinson, J. A., Battisti, A., Boonham, N., Capretti, P., Faccolia, M. 2013. Use of loop-mediated isothermal amplification for detection of *Ophiostoma clavatum*, the primary blue stain fungus associated with *Ips acuminatus*. Applied and Environmental Microbiology, 79, 8: 2527–2533
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. V: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. (ur.). New York, Academic Press. New York: 315–322
- Wingfield, B. D., Wyk, M. v., Roos, H., Wingfield, M. J. 2006. Species of *Ceratocystis*: Emerging evidence for discrete generic boundaries. V: The Ophiostomatoid Fungi: Expanding Frontiers, Brisbane, Australia, 16. –18. 8. 2006. Seifert, K. A., Beer Z. W. de, Wingfield M.J. (ur.). CBS Biodiversity, 12: 57–65
- Wingfield, M. J., Seifert, K. A., Webber, J. F. 1993. *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: Taxonomy, ecology, and pathogenicity. St. Paul, American Phytopathological Society: 304 str.
- Witthuhn, R. C., Wingfield, B. D., Wingfield, M. J., Harrington, T. C. 1999. PCR-based identification and phylogeny of species of *Ceratocystis* sensu stricto. Mycological Research, 103, 6: 743–749

- Yamaoka, Y., Wingfield, M. J., Takahashi, I., Solheim, H. 1997. Ophiostomatoid fungi associated with the spruce bark beetle *Ips typographus* f. *japonicus* in Japan. Mycological Research, 1001, 10: 1215–1227
- Yamaoka, Y., Takahashi, I., Iguchi, K. 2000. Virulence of ophiostomatoid fungi associated with the spruce bark beetle *Ips typographus* f. *japonicus* in Yezo spruce. Journal of Forest Research, 5, 2: 87–94
- Zalar, P., Gunde Cimerman, N. 2002. Taksonomija in identifikacija gliv. Ljubljana, Študentska založba: 94 str.
- Zheng, S., Dicke, M. 2008. Ecological genomics of plant insect interactions: From gene to community. Plant Physiology, 146, 3: 812–817
- Zipfel, R. D., Beer, Z. W. de, Jacobs, K., Wingfield, B. D., Wingfield, M. J. 2006. Multi-gene phylogenies define *Ceratocystiopsis* and *Grosmannia* distinct from *Ophiostoma*. Studies in Mycology, 55: 75-97

ZAHVALA

Zahvaljujem se svoji mentorici, prof. dr. Maji Jurc, brez katere se verjetno nikoli ne bi podala na to pot. Hvala, ker ste verjeli vame.

Zahvaljujem se prof. dr. Mihi Humarju in prof. dr. Borisu Hrašovcu za opravljeno recenzijo in kritično oceno disertacije.

Zahvaljujem se sodelavcem Oddelka za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire, za pomoč in za vesele dneve na Oddelku. Zahvaljujem se Danijelu Borkoviču, brez katerega bi težko opravila vsa terenska dela, predvsem pa bi bile ure terena bolj puste. Vse zahvale gredo tudi knjižničarkama Maji Peteh in Špeli Velikonja.

Za vso pomoč se zahvaljujem kolegom Gozdarskega inštituta Slovenije (GIS), predvsem prof. dr. Dušanu Jurcu, da sem determinacijski del raziskave lahko opravila v Laboratoriju za varstvo gozdov, GIS; dr. Nikici Ogrisu, ki mi je pomagal pri vpeljevanju v mikroskopski svet gliv; dr. Maartenu de Grootu za njegovo pomoč pri statističnih težavah; dr. Barbari Piškur pa iskrena hvala za njeno svetovanje pri molekularnih metodah in za izreden trud pri opravljeni recenziji.

Hvaležna sem dr. Thomasu Kirisitsu iz Institut für Forstentomologie, Forstpathologie und Forstschutz, BOKU, Dunaj, za vso strokovno pomoč in spodbudo, ki me je s svojim entuziazmom tudi navdihoval.

Terenski del raziskave je potekal ob pomoči Zavoda za gozdove Slovenije. Hvala vsem, ki ste mi pomagali pri izbiri raziskovalnih ploskev: Dragan Štrbac, Miran Škulj, Janja Lukanc, Vida Papler Lampe, Vlado Petrič, Jani Bolarič.

Hvala prof. dr. Francu Batiču za dovoljenje uporabe laboratorija na Katedri za aplikativno botaniko, ekologijo, fiziologijo rastlin in informatiko za izvedbo molekularnega dela raziskave in doc. dr. Bojki Kump za pomoč pri izvedbi molekularnih analiz.

Delo je bilo opravljeno okviru financiranja mlade raziskovalke preko Javne agencije za raziskovanje (ARRS).

Na koncu se zahvaljujem svojim dragim, sestrama, bratu, staršem in prijateljem, brez vašega veselja in podpore ne bi bila sposobna zaključiti tega dela. Za vso pomoč na terenu v Litiji pa sem hvaležna predvsem Anji Ptiček in Mihi Bernardu. Največja zahvala pa gre mojemu izjemnemu Nicolasu ter najinima Ivanu in Pauline, ker dajete smisel mojemu življenju!