

POROČILO O PRESKUSU ŠT.: U2016-004

Naročnik: Zavod za gozdove, OE Murska Sobota
Številke zapisnikov: /
Št. vzorca iz zapisnika: /
Opis vzorcev: - Več vzorcev skorje črne jelše (*Alnus glutinosa*), nabranih na dveh terenskih dneh 3. 11. 2015 in 29. 9. 2015 (Črni log)
- Micelijske pahljačice *Armillaria* sp., ki so bile odvzete pod skorjo črne jelše na terenskem pregledu v Črnem logu dne 25. 9. 2015
Datum prejema vzorcev: 25. 9. 2015 in 3. 11. 2015
Čas izvajanja preskusa: 28. 9. 2015–20. 1. 2016
Datum izdaje poročila: 2. 2. 2016
Namen testiranja: ugotavljanje povzročiteljev odmiranja črne jelše:
- *Phytophthora* sp.
- *Armillaria* sp.

Vzorec	Metoda	Rezultat	Opomba
Dva (2) vzorca micelijskih pahljačic	LVG Molekularna analiza - Glive	Vrsta iz kompleksa <i>Armillaria gallica</i> / <i>Armillaria cepistipes</i>	
Šest (6) izolatov <i>Phytophthora</i> sp., pridobljenih iz šestih (6) različnih vzorcev skorje	LVG Molekularna analiza – Glive (<i>Phytophthora alni</i>)	<i>Phytophthora alni</i> subsp. <i>multiformis</i>	
Šest (6) izolatov <i>Phytophthora</i> sp.	LVG Morfološka analiza – Glive	<i>Phytophthora</i> spp.	<i>Phytophthora alni</i> ali <i>P. cambivora</i>

Analizni izvid opravili:
dr. Barbara Piškur, dr. Nikica Ogris

Tehnično odgovornost prevzema:
prof. dr. Dušan Jurc

DODATEK K ANALIZNEMU IZVIDU ŠT.: U2016-004

1) VZORČENJE, IZOLACIJA ČISTIH KULTUR, MOLEKULARNE IN MORFOLOŠKE ANALIZE

Dne 25. 9. 2015 in 3. 11. 2015 smo si skupaj s predstavniki ZGS, OE Murska Sobota in Gozdarske inšpekcije ter raziskovalko iz Avstrije dr. Tamaro Corcobado Sánchez (3. 11. 2015) ogledali sestoj črne jelše (*Alnus glutinosa*) v Črnem Logu (odsek 01 024-C). Pri obeh terenskih dneh smo odvzeli več vzorcev skorje črne jelše (odmiranje, sušenje, izcejanje iz skorje), ki smo jih shranili v destilirani vodi v steklenih kozarcih. Po prenosu v laboratorij LVG smo izolirali čiste kulture iz nabranih vzorcev na selektivno gojišče P₅ARPH, ki smo jih kasneje precepili na agar V8. V nadaljnje molekularne postopke smo izbrali izolate, ki so izrasli iz vzorcev z oznakami: »vzorec #2«, »vzorec #3«, »vzorec #4«, »vzorec #5« in dva vzorca »3.1« ter »3.2.«.

Na prvem terenskem ogledu (25. 9. 2015) smo na jelšah pod skorjo opazili tudi prisotnost micelijskih pahljačic, značilnih za razrast štorovk (*Armillaria* sp.). Odvzeli smo dva vzorca za nadaljnjo analizo.

Za ekstrakcijo genomske DNA iz čistih kultur in iz micelijskih pahljačic smo uporabili komercialni kit Nucleospin Plant Kit (Macherey-Nagel, Nemčija).

Za pomnoževanje regije ITS smo uporabili začetna oligonukleotida ITS1 in ITS4, pomnoženo regijo smo nato tudi sekvenirali in s filogenetsko primerjavo umestili vzorce do vrste.

Za *Phytophthora* sp. smo dodatno uporabili specifične začetne oligonukleotide, ki so jih razvili Ios et al. (2005) in ki omogočajo razlikovanje med podvrstami vrste *Phytophthora alni*.

Podatki o analizah in uporabljenih kemikalijah so zavedeni v evidenčnih listih izvedenih analiz, ki so shranjeni v arhivu Laboratorija za varstvo gozdov GIS.

Analiza	Oznaka
Ekstrakcija DNA	LVG E15/13 in LVG E15/22
PCR	LVG A15/24, LVG A15/36, LVG A15/38, LVG A16/5
Čiščenje in sekveniranje	P15/7

Na osnovi analiziranih vzorcev in izvedenih analiz sklepamo, da so vzorci micelijskih pahljačic vrsta štorovk iz kompleksa *Armillaria gallica* / *A. cepistipes* (Slika 1). Vzorci *Phytophthora* sp. pa so glede na primerjavo sekvenc (nukleotidnih zaporedij) vrsta *P. alni* (Slika 2), podvrsta pa je glede na rezultate s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi *P. alni* **subsp. multififormis** (Slika 3).

Z morfološko analizo čistih kultur smo pri vseh vzorcih ugotovili prisotnost oospor z značilno razbrazdano (mehurjasto) celično steno, ki je značilna za *P. alni* in *P. cambivora*. Oospore so bile brezbarvne, okrogle, s premerom 32,4–47,0 (41,3) µm.

2) RAZPRAVA IN PREDLOGI ZA UKREPANJE

Jelševa fitoftora *P. alni* ima tri podvrste: *P. alni* subsp. *alni* (Paa), *P. alni* subsp. *uniformis* (Pau) in *P. alni* subsp. *multiformis* (Pam) (Brasier in sod. 2004). Virulentnost in patogenost podvrst se razlikuje. Najbolj agresivna in patogena je podvrsta *P. alni* subsp. *alni* (Paa). Ostali dve podvrsti sta bistveno manj agresivni, vendar še vedno patogeni za jelšo. Raziskovalci so dokazali, da je podvrsta Paa nastala s hibridizacijo ostalih dveh vrst Pau in Pam (Ioos in sod. 2006). Jelševa fitoftora se širi s pomočjo zoospor na površini voda in povzroča bolezen, ki smo jo poimenovali »jelševa sušica«. Drevo navadno okuži skozi skorjo na koreninskem vratu (Webber in sod., 2004).

Strnadova in sod. (2010) so z raziskavo ugotovili, da jelševa fitoftora povzroči značilno več škode na jelšah, ki so pod vplivom poplav. Poplave povzročijo zmanjšano odpornost jelše, zmanjša se prenos dušika in drugih hranil iz korenin, onemogočena je rast korenin, kar se posledično odraža v hitrejšem napredovanju bolezni, ki jo povzroča *P. alni*. Jelševa fitoftora povzroča odmiranje kambija in vseh živih tkiv skorje in lesa v deblu in koreninah (slika 5). Jelševi sestoji na višjih lokacijah, so bili redkeje okuženi z jelševo fitoftoro, ker so bili pod manjšim vplivom visokega vodostaja (Schumacher in sod., 2006).

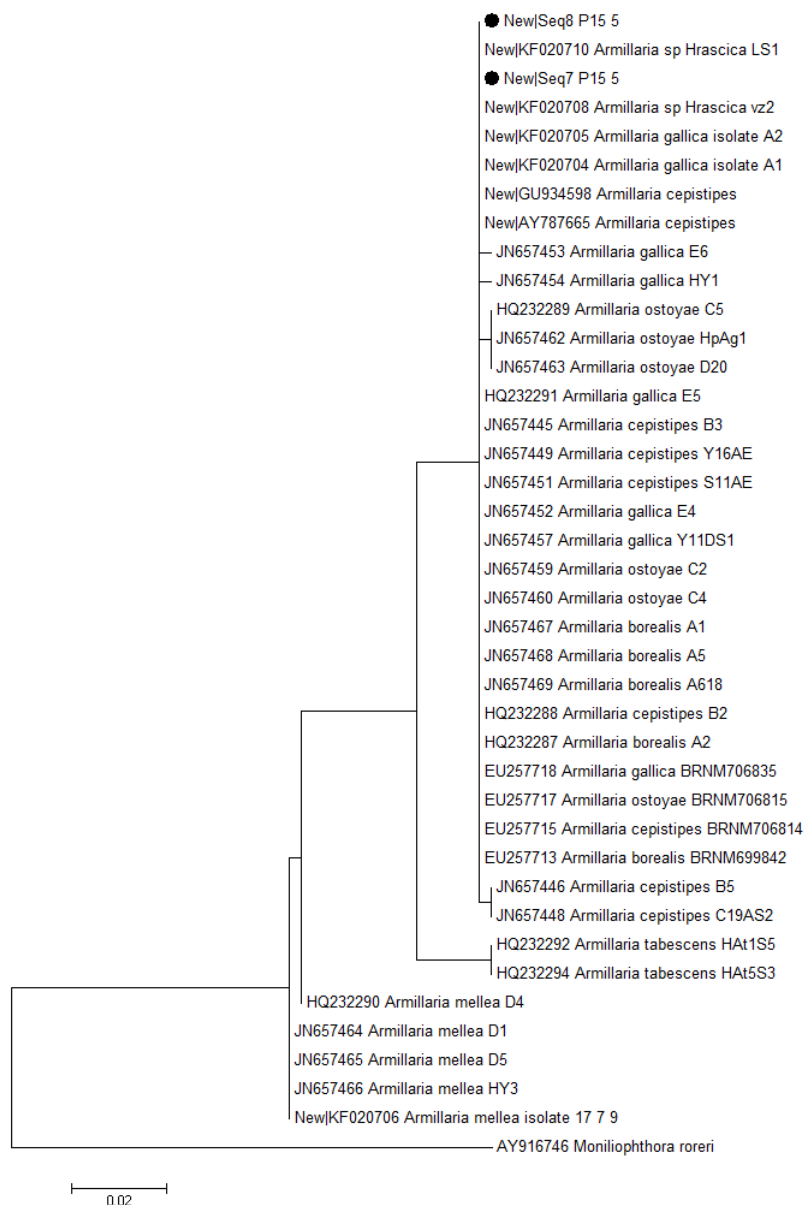
Menimo, da je v Črnem logu prišlo do enakega pojava, kot ga omenjajo raziskovalci iz drugih držav: dolgotrajna poplava je zmanjšala odpornost jelš in *P. alni* subsp. *multiformis* je tako lahko hitro povzročila velikopovršinske poškodbe jelš. Fitoftora okuži jelšo z zoosporami, ki imajo dva bička in v vodi aktivno plavajo, gostitelja najdejo s kemotaksijo. So obligatno biotrofni organizmi. Jelševa fitoftora je posebnost v tem, da ne oblikuje trajnih trosov (klamidospor) in občutljiva je na mraz, tako, da mrzlo vreme pozimi predstavlja veliko redukcijo v njenem infekcijskem potencialu. Nova območja okuženosti lahko zavzame le ob poplavah ali z vnosom okuženih sadik jelše. Glede na dejstvo, da je sušenje jelš v Črnem logu povzročila manj patogena podvrsta jelševe fitoftore (Pam) in predvsem dolgotrajna poplava, lahko podamo naslednja priporočila:

- Čim hitrejši posek poškodovanih jelš. Značilno znamenje bolezni, t.j. iztekanja črnega ali oranžnega izcedka iz okužene skorje, ni edini simptom okuženosti drevesa (sliki 6 in 7). Okužba se kaže tudi v manjših listih (v kolikor obsežno odmirajo korenine), redko olistani krošnji, prezgodnjem odpadanju listja in včasih v rumenjenju listja v vegetacijski dobi (slika 8). Domnevamo, da je okužba sestojev, ki smo jih pregledali, izjemno močna in večina dreves, ki morda ne kažejo očitnih znamenj okužbe, so v veliki meri okužena – v dnu dreves z nejasnimi simptomi poškodb smo tudi opazili odmirajoče (temne) predele v kambiju in skorji.
- V primeru, da domnevate, da bodo dogodki dolgotrajnih poplav redki (npr. 1× na 30 let), priporočamo, da ponovno posadite črno jelšo. Obstajajo dokazi, da so nekatere populacije jelš na Češkem (različne provenience) bolj odporne na jelševo sušico kot druge, vendar take raziskave pri nas še niso bile opravljene. Zato ne moremo priporočiti provenience semena jelše, iz katere naj bodo vzgojene sadike.
- v primeru, da domnevate, da bodo dolgotrajne poplave pogostejše, priporočamo, da zasnujete nekoliko bolj mešano drevesno sestavo: poudarek naj bo še vedno na črni jelši, ki pa ji primešate vrbo, dob, poljski brest, vez in čremso. Mešani sestoji z več drevesnimi vrstami bodo po našem mnenju bolj uspevali v neznani prihodnosti tega poplavnega območja.

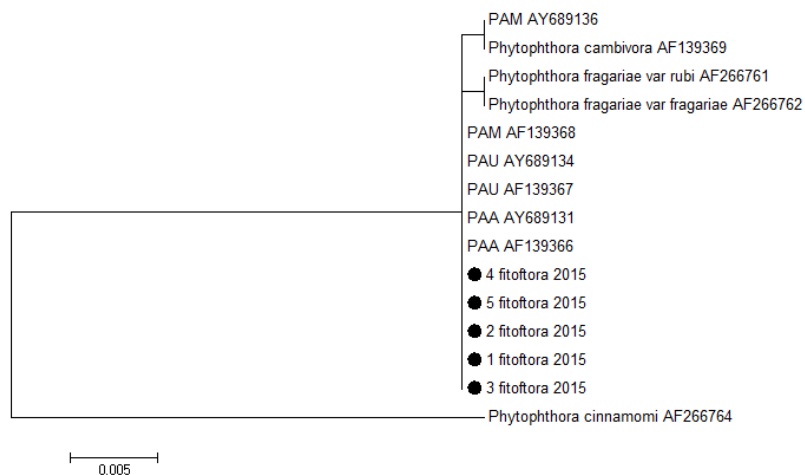
V odvzetih vzorcih smo ugotovili tudi vrsto, ki pripada ali rumenovenčni mraznici (*Armillaria gallica*) ali pa čebulasti mraznici (*A. cepistipes*). *A. gallica* je sekundaren parazit korenin, *A. cepistipes* pa saprofit. Zato zaradi prisotnosti te glive ni potrebno ukrepati, verjetno je gliva okužila jelšo po odmiranju skorje in korenin zaradi jelševe sušice.

V prispevku ne obravnavamo problema sušenja jelše v Prekmurju celostno in predvsem ne podajamo pregleda vseh objavljenih podatkov, mnenj in priporočil, ki nakazujejo strokovne rešitve problema hitrega odmiranja jelš v vsej Evropi. Za takšno delo bi morali odvzeti mnogo več vzorcev, da bi dobili vpogled v dejansko vrstno (in podvrstno) sestavo patogenov v propadajočih jelševih sestojih in pridobiti obsežno publicirano gradivo, ki nam v tem trenutku ni dostopno. Edino delo v zvezi s jelševo sušico v Prekmurju so objavili Munda in sod. (2006), kjer poročajo o identifikaciji *P. alni* ssp. *uniformis*, kar potrjuje nujnost podrobnejšega vpogleda v podvrstno sestavo jelševe fitoftore pri nas. Ker dobiva velikost pojava odmiranja jelš pri nas velike razsežnosti, smo predlagali posebno raziskavo v zvezi s fitoftorami v slovenskih gozdovih (predlog CRP projektov). Nadejamo se, da nam bo omogočeno poglobljeno delo s tem izjemno škodljivim rodом glivolikih alg.

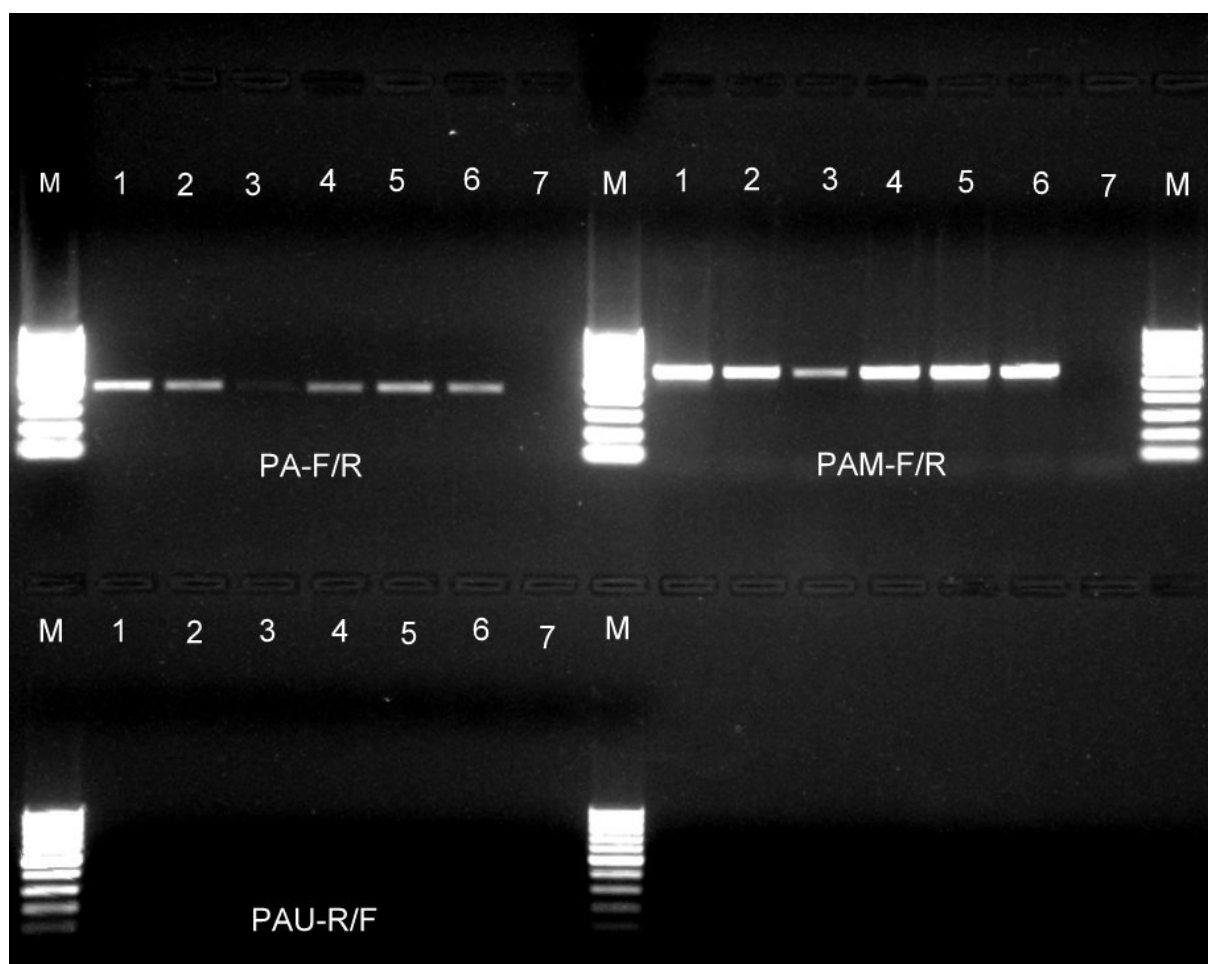
3) DOKUMENTACIJA S FOTOGRAFIJAMI



Slika1: Filogenetsko drevo; vzorci nabrani v Črnem logu so označeni z ●.



Slika 2: Filogenetsko drevo, vzorci nabrani v Črnem logu so označeni z ●.



Slika 3: Ločba produktov reakcije PCR pri temperaturi naleganja 58 °C s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi PA-F/R (pričakovan pomnožek velikosti 450 bp pri vseh podvrstah *P. alni*), PAM-F/R (pričakovan pomnožek velikosti 590 bp pri podvrstah *P. alni* subsp. *alni* in *P. alni* subsp. *multiformis*) ter PAU-R/F (pričakovan pomnožek velikosti 750 bp pri podvrstah *P. alni* subsp. *alni* in *P. alni* subsp. *uniformis*). Vzorci DNA: 1–6 (čiste kulture, pridobljene iz vzorcev skorje črne jelše), 7 (negativna kontrola PCR), M (lestvica DNA).



Slika 4: Oogoniji *Phytophthora alni* z značilno razbrazdano celično steno (A) in dvoceličnim amfiginimi anteridijem (B) – nastajanje oospor (foto N. Ogris)



Slika 5: Rjave lise v skorji so odmrla tkiva, ki jih je povzročila jelševa sušica (foto D. Jurc)



Slika 6: Črn izcedek iz nekrotizirane skorje (foto: D. Jurc)F



Slika 7: Izcedek iz skorje je lahko najprej oranžen, kasneje počrni (foto: D. Jurc)



Slika 8: Močno sušenje jelševega sestoja, kjer je bila ugotovljena jelševa sušica: večini dreves je listje prezgodaj odpadlo, vitalna drevesa so še olistana (3. 11. 2015) (foto: D. Jurc)

4) VIRI

- Brasier C.M., Kirk S.A., Delcan J., Cooke D.E.L., Jung T., Man In't Veld W.A. 2004. *Phytophthora alni* sp. nov. and its variants: designation of emerging heteroploid hybrid pathogens spreading on *Alnus* trees. *Mycological Research*, 108, 10: 1172-1184.
- Ioos R., Andrieux A., Marçais B., Frey P. 2006. Genetic characterization of the natural hybrid species *Phytophthora alni* as inferred from nuclear and mitochondrial DNA analyses. *Fungal Genetics and Biology*, 43, 7: 511-529.
- Ioos R., Husson C., Andrieux A., Frey P. 2005. SCAR-based PCR primers to detect the hybrid pathogen *Phytophthora alni* and its subspecies causing alder disease in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 112: 323-335
- Munda A., Žerjav M., Jakša J. 2006. Occurrence and characterization of alder *Phytophthora*, *Phytophthora alni*, in Slovenia. V: BRASIER, Clive Michael (ur.), JUNG, Thomas (ur.), OSSWALD, Wolfgang (ur.). Progress in research on Phytophthora diseases of forest trees : proceedings of the Third International IUFRO Working Party S07.02.09 Meeting at Freising, Germany, 11-18 September 2004. Farnham: Forest Research, 2006, [Poster].
- Schumacher J., Leonhard S., Gundmann B.M., Roloff A. 2006. New alder disease in Spreewald Biosphere Reserve causes and incidental factors of an epidemic. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutz*, 58, 6: 141-147.
- Strnadova V., Cerny K., Holub V., Gregorova B. 2010. The effects of flooding and *Phytophthora alni* infection on black alder. *Journal of Forest Science*, 56, 41-46
- Sullivan, M. 2010. CPHST Pest Datasheet for *Phytophthora alni*. USDA-APHIS-PPQ-CPHST.
- Webber J., Gibbs J., Hendry S., M.C. 2004. *Phytophthora* disease of alder. [http://www.forestry.gov.uk/PDF/fcin6.pdf/\\$FILE/fcin6.pdf](http://www.forestry.gov.uk/PDF/fcin6.pdf/$FILE/fcin6.pdf) (27.1.2016)

Dodatek k analiznemu izvidu sestavili:

dr. Barbara Piškur,
dr. Nikica Ogris,
prof. dr. Dušan Jurc

Tehnično odgovornost prevzema:

dr. Primož Simončič