Kraków, 26.11. 2012 r.

Katedra Fitopatologii Leśnej

Wydział Leśny UR w Krakowie
……..
Nazwa Zakładu Wiodącego

Sprawozdanie końcowe z prac wykonanych
w latach 2006 - 2012 w temacie badawczym pt.

„Ustalenie przyczyn i uwarunkowań zamierania jesionów i jaworów dla wypracowania podstaw postępowania hodowlano – ochronnego”

Kierownik tematu: Prof. dr hab. Tadeusz Kowalski

Spis treści

CZĘŚĆ I - JESION WYNIOSŁY (*FRAXINUS EXCELSIOR* L.)

1. Wstęp……4
2. Badania nad typami objawów chorobowych u jesionów…… …….5
3. Badania nad nasileniem występowania objawów chorobowych w wybranych drzewostanach południowej Polski…….7
4. Etiologiczne aspekty procesu zamierania jesionów ……..19
5. Sprawca zamierania jesionu i uwarunkowania jego rozwoju ……..26
6. Badania nad patogenicznością *Chalara fraxinea*……31
7. Badania fitopatologiczne w nowo założonych uprawach doświadczalnych ……..33
8. Wybrane elementy genetycznych i biochemicznych uwarunkowań odporności jesionu wyniosłego na zamieranie ……..36
8.1 Wstęp i cel badań genetycznych i biochemicznych……36
8.2 Materiał badawczy i metody……...37
8.3 Wyniki ……...48
9. Podsumowanie wyników ……71
10. Wnioski ……..81
11. Literatura …….....85
Aneks: Tabele 1-35; Foto 1-47

CZĘŚĆ II - KLON JAWOR (*ACER PSEUDOPLATANUS* L.)

1. Wstęp ……..2
2. Materiały i metody ……...3
3. Wyniki …… ..…5
4. Omówienie wyników …….……27
5. Podsumowanie wyników …….……..32
6. Wnioski …….……..34
7. Literatura …….……37
Aneks: Tabele 1-19

CZĘŚĆ I

JESION WYNIOSŁY (*FRAXINUS EXCELSIOR* L.)

Główni wykonawcy: Prof. dr hab. Tadeusz Kowalski
Dr inż. Wojciech Kraj

W realizacji zadań z zakresu występowania objawów chorobowych u jesionu uczestniczyli także: Mgr inż. M. Dubis, Mgr inż. P.Kowal, Mgr inż. A. Czekaj, Mgr inż. P. Materniak

1. Wstęp

Jesion wyniosły (*Fraxinus excelsior* L.) występuje na obszarze całej Europy, z wyjątkiem środkowej i południowej Hiszpanii, północnej części Półwyspu Skandynawskiego, Islandii i północnych rejonów Wysp Brytyjskich. W południowej Europie rośnie wspólnie z jesionem wąskolistnym (*F. angustifolia* Vahl) i jesionem mannowym (*F. ornus* L.) (Jaworski 2011, Dobrowolska i in. 2011). W Polsce jesion wyniosły obecny jest na obszarze całego kraju z wyjątkiem regla górnego. Jest cennym gatunkiem lasotwórczym występującym głównie w drzewostanach mieszanych w olsie jesionowym, lesie wilgotnym i lesie łęgowym (Jaworski 2011). Znaczenie ekologiczne jesionu wyniosłego ulegało w Europie dalszemu zwiększaniu w związku z obumieraniem wiązów w wyniku porażenia przez *Ophiostoma ulmi* (Buism.) Nannf. i *O. novo-ulmi* Brasier (Brasier 1991), a także chorobą olsz powodowaną przez *Phytophthora alni* Brasier & Kirk (Thoirain i in. 2007). Rozwój jesionu nie był też ograniczany przez znaczące choroby grzybowe czy bakteryjne (Grzywacz 1995). Tylko lokalnie czynniki biotyczne prowadziły do zamierania jesionu na większym areale (Hiemstra 1995). Sytuacja ta zaczęła jednak ulegać zasadniczej zmianie. W 1992 roku pojawiły się objawy nasilonego zamierania jesionu w północno-wschodniej Polsce (Stocki 2001, Sierota i in. 1993). W następnych latach proces ten rozszerzał się na inne obszary kraju (Kowalski 2001, Przybył 2002), obejmując powierzchnię ponad 10 tysięcy hektarów (Gil i in. 2006). Jesion wyniosły zaczął także zamierać w krajach nadbałtyckich oraz na Półwyspie Skandynawskim, a następnie w krajach zachodniej, a stopniowo także krajach południowej Europy. Gatunek ten dotknięty jest obecnie procesem chorobowym w ponad 20 krajach Europy (Timmermann i in. 2011). W 2012 roku stwierdzono pierwsze objawy zamierania na Wyspach Brytyjskich (Coghlan 2012).

Początkowo objawy obserwowano tylko na *Fraxinus excelsior*. Badania w Austrii wykazały, że porażany jest także jesion wąskolistny (*F. angustifolia* Vahl) i jesion mannowy (*F. ornus* L.), przy czym tylko jesion wąskolistny cechuje się stosunkowo dużą podatnością [Kirisits i in. 2009]. Objawy porażenia *F. angustifolia* obserwowano także w Słowenii, Rumunii, w Czechach i na terenie Niemiec [Schumacher i in. 2007, Jankovsky, Holdenrieder 2009]. Badania w Estonii wskazały na obecność symptomów chorobowych zarówno u pochodzącego z Azji jesionu mandżurskiego (*F. mandshurica* Rupr.) jak i u jesionów amerykańskich: *Fraxinus nigra* (j. czarny), *F. pennsylvanica* (j. pensylwański) i *F. americana L.* (j. biały). Spośród tych gatunków, u *F. mandshurica* i *F. americana* dochodziło często do więdnięcia liści [Drenkhan, Hanso 2010]. Dotychczas nie stwierdzono zamierania jesionu powodowanego przez *Ch. fraxinea* na żadnym innym kontynencie poza Europą.

Początkowo proces zamierania jesionu wiązano z niekorzystnym wpływem czynników abiotycznych (Thomsen, Skovsgaard 2006), zwłaszcza że wrażliwość jesionu na niektóre czynniki abiotycznie jest dobrze udokumentowana (Jaworski 2011). Jednak stałe zwiększanie areału i nasilenia procesu choroby zaczęło wskazywać, że przyczyną jest choroba infekcyjna. Już wstępne badania prowadzone w tym zakresie w Polsce doprowadziły do stwierdzenia, że w nekrotycznych tkankach na pędach jesionów często można stwierdzać jeden gatunek grzyba, który w koloniach *in vitro* wytwarzał na drodze wegetatywnej zarodniki konidialne i na tej podstawie mógł zostać zakwalifikowany do rodzaju *Chalara* (Kowalski 2001). W związku z dużymi stratami, w jednostkach podległych PGL Lasy Państwowe zalecono zaniechanie hodowli jesionu i jego wprowadzania do upraw do czasu wypracowania skutecznych metod ograniczenia postępu choroby. W 2006 roku rozpoczęto bardziej rozległe badania nad przebiegiem i uwarunkowaniami procesu chorobowego jesionu. W obecnym opracowaniu przedstawiono wyniki badań w tym zakresie.

2. Badania nad typami objawów chorobowych u jesionów

Badania dotyczące typów symptomów chorobowych u jesionu wyniosłego prowadzono na terenie południowej Polski, zwłaszcza w Nadleśnictwie Andrychów, Gryfice, Kańczuga, Łosie, Mircze, Miechów, Radymno, Rymanów, Sieniawa, Stary Sącz, Staszów, Włoszczowa, oraz dla celów porównawczych na terenie północno-zachodniej Polski, w Nadleśnictwie Rokita, Resko i Gryfice (RDLP Szczecin). W wybranych drzewostanach o różnym wieku dokonywano analizy symptomów chorobowych występujących u chorych, zamierających i martwych jesionów. W ocenie tej uwzględniano stan zdrowotny liści, gałęzi, pędów głównych, pni oraz korzeni. Uzyskane wyniki dały podstawę do wyróżnienia i dopracowania charakterystyki symptomów chorobowych, które w znacznym stopniu wykorzystano w realizacji następnych zadań, zwłaszcza do oceny nasilenia procesu chorobowego oraz analizy składu gatunkowego i ilościowego mykobiota w obrębie tkanek roślinnych wykazujących zmiany chorobowe. U analizowanych jesionów stwierdzono następujące objawy chorobowe*:*

a) w obrębie aparatu asymilacyjnego - więdnięcie, przebarwienia i nekrozy lokalne lub całkowite liści oraz ich przedwczesny opad, prowadzący do przerzedzenia korony. Zmiany chorobowe na liściach miały różne przyczyny. Były wynikiem infekcji blaszek liściowych lub nerwu głównego, względnie nerwów bocznych. Nekroza nawet niewielkiego odcinka nerwu głównego prowadziła do obumarcia całej części położonej powyżej nekrozy. Zmiany w obrębie aparatu asymilacyjnego były także następstwem symptomów występujących na innych organach

drzew, zwłaszcza na pędach, gałęziach i pniach, a w pewnym stopniu także w obrębie systemu korzeniowego. Powodowane przez grzyby uszkodzenia na tych częściach roślin skutkowały przede wszystkim pojawianiem się objawów więdnięcia lub zasychania poszczególnych liści od brzegów blaszki liściowej. W takich przypadkach nie dotyczyły one pojedynczych liści lub ich części, lecz większości liści rozwiniętych na danej gałęzi lub w określonej części korony. Objawy takie pojawiały się w ciągu całego okresu wegetacyjnego, lecz były szczególnie zauważalne w pierwszej połowie lata, na tle soczystej zieleni listowia drzew zdrowych (Fot. 5-8, 24). Charakterystyczne jest przy tym zjawisko występowania objawów więdnięcia przy braku wyraźnych rozległych nekroz na niżej położonych częściach pędów. Dokładne analizy wielokrotnie potwierdziły, że od pierwotnych miejsc infekcji nekroza postępuje wzdłuż miazgi i łyka (Fot. 9-10), a dopiero w późniejszym okresie nekrozy są dostrzegalne jako objawy zewnętrzne. Stąd występowanie objawów więdnięcia liści przy braku widocznych rozległych nekroz kory.

Do charakterystycznych symptomów porażenia liści jesionu (jak późniejsze badania wykazały ma to związek z porażeniem przez grzyb *Chalara fraxinea*) należy zaliczyć lokalne nekrozy zwłaszcza na nerwach głównych, prowadzące do nieregularnego przebarwienia tkanek. Niekiedy dochodzi do jasnego przebarwienia w miejscu nekrozy, czemu mogą towarzyszyć przewężenia (Fot. 1-4, 42-44, 46-47).

Oprócz symptomów ściśle związanych z działalnością zasadniczego sprawcy choroby jesionów, grzyba *Chalara fraxinea,* na liściach jesionu stwierdzano również zmiany nekrotyczne jako skutek chorobotwórczej działalności innych patogenów, zwłaszcza z rodzaju *Venturia, Phyllosticta* i *Mycosphaerella.* O zadecydowaniu, czy dane objawy chorobowe powoduje *Chalara fraxinea,* czy inny patogen podstawą są przeważnie wyniki izolacji, gdyż *Chalara fraxinea* bardzo rzadko w obrębie nekroz na liściach przed ich opadem wytwarza zarodnikowanie konidialne. Oprócz wymienionych objawów, stwierdzano przypadki braku przebarwień nekrotycznych na liściach, zaś przebarwienia etiologiczne obecne były przede wszystkim po dolnej stronie blaszek liściowych. Były to skutki porażenia przez mączniaki prawdziwe.

b) w obrębie korony - zamieranie całych gałęzi lub ich szczytów, zamieranie wierzchołków, nekrozy lokalne zabliźnione i niezabliźnione oraz zrakowacenia na gałęziach. Objawy te wiązały się z nieregularnym ulistnieniem korony. Na stan taki wpływało również tworzenie pędów przybyszowych wzdłuż żywych nasadowych części gałęzi, zwłaszcza o większej średnicy (Fot. 17-21).

c) w obrębie strzałek i pni – na pniach drzew starszych oraz na strzałkach drzew młodych występowały: nekrozy kory zabliźnione i niezabliźnione, raki drzewne połączone z zapadaniem kory oraz miejscową hipertrofią, podłużne lub tafelkowate spękania kory, wykruszanie kory prowadzące do odsłaniania drewna. Nekrozom towarzyszyły na ogół przebarwienia kory. W

miejscach nekroz przebarwienia kory miały charakter jednolity lub smugowaty (Fot. 13–16). W zdecydowanej większości przypadków w obrębie pierwotnych miejsc infekcji, kora przebarwiała się na kolor jasno-brunatny, zaś na pograniczu części nekrotycznej z częścią żywą, kora była ciemnobrunatna (Fot. 13, 15). Wycieki brunatnej substancji w miejscu nekroz i pęknięć kory, lub zrakowaceń pojawiały się stosunkowo rzadko (Fot. 11). Do objawów wewnętrznych należały: przyobwodowe przebarwienia drewna, przebarwienia w formie sektorów klinowato zwężających się ku rdzeniowi, przebarwienia gwiaździste obejmujące twardziel i przyległe do niej kilkucentymetrowe fragmenty drewna bielastego oraz przebarwienia w kształcie litery „T". Ostatni typ przebarwień uwydatniał się zwłaszcza w powiązaniu z nekrozami lokalnymi zabliźnionymi (Fot. 25-26).

d) w obrębie korzeni – lokalne zabliźnione lub niezabliźnione nekrozy, nekrozy całych pojedynczych korzeni grubych, nekrozy i czernienie korzeni cienkich. W drewnie korzeni obserwowano przebarwienia w kształcie litery „T" w miejscach nekroz lokalnych zabliźnionych oraz szaro-brunatne rozległe przebarwienia w miejscu nekroz niezabliźnionych. Obserwowano również przypadki wytwarzania korzeni zastępczych w przypadku nekrozy i zgnilizny systemu korzeniowego (Fot. 12). U niektórych badanych jesionów, o czym będzie informacja w dalszej części opracowania, nekrozy brały początek w obrębie szyi korzeniowej i górnej części systemu korzeniowego, czemu towarzyszyło w tym obszarze szarobrunatne przebarwienie drewna. Ten typ objawu wiązał się ze stosunkowo nagłym więdnięciem liści w całej koronie, a następnie zamieraniem całego drzewa (Fot. 5, 7).

3. Badania nad nasileniem występowania objawów chorobowych w wybranych drzewostanach południowej Polski

Założenia metodyczne polegały na tym, iż w kilku nadleśnictwach południowej Polski (Staszów, Sieniawa, Radymno, Łosie) dokonano analizy nasilenia występowania objawów chorobowych charakterystycznych dla obserwowanego procesu zamierania jesionu. Drzewostany były dobierane losowo na podstawie operatu urządzeniowego tak by reprezentowały różny wiek i różne siedliska, a także w miarę możliwości inne czynniki, np. sposób odnowienia. Były to jednolite drzewostany jesionowe, lub takie, w których jesion stanowił domieszkę. Udział jesionu w lasach Polski jest nieznaczny, stąd na ogół nie było możliwym takie dobieranie drzewostanów, które zapewniły by dobrą porównywalność, tzn. by była w tym samym rejonie odpowiednia liczba drzewostanów w tym samym wieku, na takim samym siedlisku, o tym samym udziale ilościowym, formie zmieszania, sposobie odnowienia itp. W każdym drzewostanie, w jego środkowej części (wyłączano obrzeża)

dokonywano analizy stanu zdrowotnego drzew (n = 25 do 100, rosnące obok siebie w kilku rzędach lub gniazdach), wyróżniając drzewa żywe bez objawów chorobowych (drzewa "zdrowe"), drzewa żywe wykazujące symptomy chorobowe (drzewa "chore") oraz drzewa martwe. Dla dwóch ostatnich kategorii określano rodzaje symptomów chorobowych według przyjętego kodu symptomologiczno-etiologicznego. Ogółem przeanalizowano ponad 3200 drzew rosnacych w ponad 70 drzewostanach. Dalsze szczegóły metodyczne i charakterystykę drzewostanów przedstawiono oddzielnie dla poszczególnych Nadleśnictw.

Nadleśnictwo Staszów (RDLP Radom)

W terenie tego nadleśnictwa przeważają siedliska: LMśw (34,84%), BMśw (16,71%) i LMwyż (10,47%), zaś mniejszym udziałem charakteryzują się: Lwyż (8,29%), BMw (8,02%), Lśw (7,22%), LMw (5,61%), Bśw (4,94%) i Lw (2,41%). Głównym gatunkiem lasotwórczym w drzewostanach nadleśnictwa Staszów jest sosna zwyczajna, która występuje na 71,61% powierzchni. Spośród innych gatunków zajmują: dąb szypułkowy i bezszypułkowy – 12,11%; jodła – 4,90%; olsza czarna – 3,40%; buk – 3,36%; brzoza – 2,47%; modrzew – 0,71%; jesion, grab – po 0,30%; topola, świerk – po 0,17%; dąb czerwony – 0,11%; oraz osika – 0,09% (Plan Urządzania Lasu, 2002).

Badania zostały przeprowadzone w 32 drzewostanach (Tab. 1). Wiek drzewostanów wahał się od 2 do 124 lat. W każdym drzewostanie poddano szczegółowej analizie 50 lub 25 drzew rosnących obok siebie wewnątrz drzewostanu. Ogółem analizie poddano 1275 drzew, w tym 875 drzew w wieku do 20 lat (19 drzewostanów) oraz 400 drzew 21- do 124 letnich (13 drzewostanów) (Tab. 1).

W drzewostanach 2- do 20-letnich określano obecność dwóch typów objawów związanych z zamieraniem pędów głównych i gałęzi. Jeden z typów charakteryzował się zamieraniem rozpoczynającym się kilkanaście centymetrów poniżej szczytu, zaś drugi obecnością już martwego wierzchołka lub martwych szczytów gałęzi. W pierwszym z tych typów część szczytowa była jeszcze żywa. Odnotowywano także obecność nekroz zabliźnionych i niezabliźnionych, wycieki śluzu oraz obecność martwych gałęzi. W drzewostanach 21- do 124- letnich określano występowanie raków drzewnych, nekroz zabliźnionych i niezabliźnionych, nekroz podłużnych z przyległą korą, nekroz podłużnych z odsłoniętym drewnem, tafelkowatych płytkich spękań kory oraz „wilków” na pniu. Ponadto poddano ocenie stan koron na podstawie stopnia przerzedzenia - ubytku liści, udziału zamarłych gałęzi; określano także ich lokalizację w koronie.

W trakcie przeprowadzonych badań w drzewostanach do 20 lat drzewa martwe stanowiły 17,0%, a żywe 83,0% (Tab. 2). Najczęstszymi objawami chorobowymi na pędach głównych młodych drzew były nekrozy lokalne zabliźnione (31,5% drzew). Poza tym stwierdzono: nekrozy niezabliźnione na 75 drzewach (8,6%), martwe wierzchołki u 120 drzew (13,7%), wycieki śluzu u

12 drzew (1,4%) oraz zamieranie pędu kilkanaście centymetrów poniżej szczytu u 2 drzew (0,2%) (Tab. 3). Najczęściej spotykane były drzewa, u których na pędach głównych było do 2 nekroz lokalnych zabliźnionych i niezabliźnionych (odpowiednio 22,6% i 7,0%). Stosunkowo rzadko występowało na pędzie głównym powyżej 10 sztuk nekroz zabliźnionych (0,4%) lub nie zabliźnionych (0,1%). Najczęstszymi objawami występującymi w koronach drzew w wieku do 20 lat były martwe gałęzie, które stwierdzono u 234 jesionów (26,7%), martwe szczyty gałęzi - u 186 drzew (21,3%), nekrozy lokalne zabliźnione - u 67 drzew (7,7%), nekrozy lokalne niezabliźnione - u 24 drzew (2,7%) oraz zamieranie gałęzi kilkanaście centymetrów poniżej szczytu – u 16 drzew (1,8%) (Tab. 4). Nekrozy lokalne zabliźnione i niezabliźnione występowały także na gałęziach. Pierwsze z nich stwierdzono u 7,7% drzew, przy czym w większości tworzyły się one w jednym lub w dwóch miejscach (5,4% drzew). Nekrozy lokalne niezabliźnione stwierdzono u 2,7% drzew, z czego u 1,8% drzew tworzyły się w tylko w jednym lub dwóch miejscach. Stosunkowo częstym objawem chorobowym było zamieranie szczytów gałęzi. U 5,7% drzew zamierały szczyty 51-75% gałęzi, a u 2,3% drzew ponad 75% gałęzi w koronie drzewa (Tab. 5).

W analizowanych drzewostanach powyżej 20 lat, drzewa martwe stanowiły 1,7% (Tab. 6). U żywych drzew występowały różnorodne objawy chorobowe. Najczęściej pojawiały się „wilki" na pniu, które stwierdzono na 238 drzewach (59,5%). Licznie występowały także nekrozy lokalne zabliźnione, które stwierdzono na pniach 234 drzew (58,5%). Proces infekcji drzew zdaje się trwać nadal, gdyż u 12% drzew występowały nekrozy lokalne niezabliźnione. Tafelkowate płytkie spękania kory stwierdzono na pniach 215 drzew (53,8%). Nekrozy podłużne z przyległą korą zaobserwowano na 167 drzewach (41,8%), zaś nekrozy podłużne z odsłoniętym drewnem – na pniach 42 drzew (10,5%). Najrzadziej pojawiały się symptomy w formie raków drzewnych, których obecność stwierdzono na pniach 16 drzew (4,0%) (Tab. 6).

Objawy występujące w koronach drzew dotyczyły przede wszystkim zamierania wierzchołków, gałęzi i przerzedzenia aparatu asymilacyjnego. Martwy wierzchołek stwierdzono u 48 drzew (12,0%). W poszczególnych drzewostanach udział drzew z tym objawem wahał się od 8,0% do 36,0%. Tylko w czterech, spośród 13 drzewostanów badanych, nie stwierdzono drzew z tym objawem. Zamieranie gałęzi w koronach wystąpiło u wszystkich badanych drzew. Drzewa, u których było do 50% zamarłych gałęzi w koronach stanowiły 87,8% zaś udział drzew, u których zamarło ponad 50% gałęzi w koronie wynosił 12,2%. Objaw ten pojawiał się najczęściej w dolnej części korony – 47,0% drzew, rzadziej w obrębie całej korony – 23,5% drzew, w dolnej i środkowej części korony – 20,0% drzew, oraz sporadycznie w obrębie dolnej i górnej części korony – u 0,5% drzew (Tab. 7). Objawy przerzedzenia aparatu asymilacyjnego wystąpiły u wszystkich badanych 393 żywych drzew. U 60,7% drzew ubytek dotyczył do 25% stanu ulistnienia, u 5,8% drzew objął powyżej 75% stanu ulistnienia (Tab. 8).

W młodych drzewostanach analizę przeprowadzono w czterech przedziałach wiekowych: poniżej 5 lat, 6 do 10 lat, 11 do 15 lat i 16 do 20 lat. Największy udział żywych drzew stwierdzono w uprawach i odnowieniach naturalnych w wieku do 5 lat (99,7% drzew). Z kolei największy udział drzew martwych stwierdzono w podrostach i młodnikach w wieku od 16 do 20 lat (45,0% drzew) (Tab. 2). Największym udziałem drzew z objawami nekroz lokalnych zabliźnionych na pędach głównych charakteryzowały się drzewostany 11-15- letnie (54,0% drzew). Najmniej drzew z takimi nekrozami było w uprawach w wieku do 5 lat (9,7% drzew). Udział drzew z nekrozami lokalnymi niezabliźnionymi był największy w drzewostanach 6-10- letnich (16,7%), zaś najmniejszy w nalotach poniżej 5 roku życia (1,3%). Najwięcej drzew z martwym wierzchołkiem stwierdzono w 11-15- letnich młodnikach i podrostach (23,0%) (Tab. 3). Młode drzewa z objawami martwych szczytów gałęzi spotykane były najczęściej w drzewostanach 11-15-letnich (39,5%), zaś udział drzew z martwymi gałęziami był największy w drzewostanach 6-10-letnich (46,2% drzew). W nalotach jesionowych poniżej 5 lat nie stwierdzono takich objawów jak zamieranie gałęzi kilkanaście centymetrów poniżej szczytu, zamieranie całych gałęzi lub ich szczytów oraz nekroz lokalnych. Najwięcej drzew z objawami nekroz lokalnych zabliźnionych (13,8%) i niezabliźnionych (5,5%) na gałęziach zaobserwowano u drzew w drzewostanach 6-10-letnich. Objawy nekroz lokalnych zabliźnionych i niezabliźnionych najrzadziej pojawiały się na gałęziach drzew w wieku od 16 do 20 lat (Tab. 4). W poszczególnych przedziałach wieku różnice dotyczyły również zamierania szczytów gałęzi. Zamieranie szczytów gałęzi w stopniu od 26 – 50% występowało najczęściej u 6-10-letnich jesionów (14,5% drzew). Zamieranie szczytów u więcej niż 75% gałęzi w koronie stwierdzono u 5,0% drzew w wieku od 11 do 15 lat i u 4,0% drzew w wieku 16-20 lat. W drzewostanach młodszych nasilenie tego objawu było mniejsze (Tab. 5).

W starszych drzewostanach analizowano drzewa w 4 przedziałach wiekowych: 21 do 40 lat, 41 do 60 lat, 61 do 80 lat oraz powyżej 80 lat. Wilki na pniach występowały stosunkowo licznie we wszystkich drzewostanach w wieku powyżej 20 lat, lecz stwierdzane były nieco liczniej na pniach drzew 21-40- letnich (70,7%). Najrzadziej objaw ten pojawiał się na jesionach w wieku od 61 do 80 lat (52,7%) (Tab. 6). Nekrozy lokalne zabliźnione obserwowane były najczęściej (64,0% drzew) w drzewostanach 41-60-letnich. Występowały jednak również licznie w pozostałych przedziałach wiekowych, gdzie udział drzew z tymi objawami wynosił 55,3 do 60,0% drzew. Tafelkowate płytkie spękania kory obserwowano najczęściej na drzewach w wieku powyżej 80 lat (77,3%). W drzewostanach w wieku powyżej 80 lat zaobserwowano najwięcej drzew z symptomami nekroz lokalnych niezabliźnionych (20,0% drzew), nekroz podłużnych z przyległą korą (65,3%) i z odsłoniętym drewnem (18,7%) oraz z objawami raków drzewnych (6,7%). Drzewa martwe obecne

były tylko w drzewostanach 21-40- letnich (9,3%). Na uwagę zasługuje stosunkowo niski udział drzew z objawami nekroz lokalnych niezabliźnionych u drzew w wieku 21-40 oraz 41-60 lat wynoszący odpowiednio 5,3% i 6,0% (Tab. 6). W starszych drzewostanach jesionowych drzewa z objawami zamierania gałęzi w koronach występowały we wszystkich przedziałach wiekowych. Do 50% zamarłych gałęzi wykazywało 90,0% drzew w wieku 41-80 lat. Drzewa, u których udział martwych gałęzi był wyższy niż 50% najliczniej wystąpiły w drzewostanach 21-40- letnich (20,0%). U drzew w wieku od 41-60 lat obumarłe gałęzie najczęściej zlokalizowane były w dolnej części korony (51,0% drzew), u drzew 21-40- letnich odsetek takich drzew wynosił 36,0%. W środkowej i górnej części korony zamierały gałęzie u 1,3% drzew w wieku 21-40 lat do 8,0% u drzew 41-60- letnich. Martwy wierzchołek najczęściej zaobserwowano u jesionów 21-40-letnich (24,0%). Stosunkowo duży był odsetek takich drzew w wieku powyżej 80 lat (10,7% drzew) (Tab. 7). Stopień przerzedzenia koron nieco wyraźniej zaznaczał się u drzew w wieku powyżej 80 lat, gdzie u 17,3 % drzew stwierdzono ubytek 51-75% stanu ulistnienia (Tab. 8).

W młodych drzewostanach pochodzenia naturalnego udział drzew martwych był prawie 8-krotnie mniejszy niż w drzewostanach założonych sztucznie. Poza tym, w drzewostanach odnowionych naturalnie udział drzew żywych bez objawów nekroz był wyższy (69,7%) niż w drzewostanach pochodzenia sztucznego (14,0%) (Tab. 2).

Także udział młodych jesionów z objawami stwierdzonymi na pędach głównych był wyraźnie większy w drzewostanach sztucznych, w porównaniu z drzewostanami naturalnymi. Dotyczyło to wszystkich analizowanych grup objawów chorobowych: nekroz lokalnych zabliźnionych i niezabliźnionych, martwych wierzchołków i wycieków śluzu (Tab. 3). Drzewa z martwymi szczytami gałęzi występowały 6-krotnie częściej, drzewa z martwymi gałęziami ponad 3-krotnie częściej w drzewostanach pochodzenia sztucznego w porównaniu z naturalnymi (Tab. 4).

Z objawów analizowanych na pniach drzew nieco częściej pojawiały się u jesionów pochodzenia sztucznego raki drzewne (4,4%), nekrozy podłużne z odsłoniętym drewnem (12,7%) oraz nekrozy lokalne niezabliźnione (12,4%). W drzewostanach naturalnych częściej występowały drzewa z objawami nekroz lokalnych zabliźnionych (67,2%), nekroz podłużnych z przyległą korą (45,6%), „wilków" na pniu (65,6%) oraz tafelkowatych płytkich spękań kory (58,4%). Wszystkie martwe drzewa pochodziły z odnowienia sztucznego (Tab. 6). Zamieranie gałęzi o nasileniu do 50% w koronach starszych drzew wystąpiło częściej u jesionów odnowionych naturalnie (96,0%), natomiast rzadziej w takich drzewostanach obecne były drzewa z nasileniem powyżej 50% (4,0%). Drzewa z martwym wierzchołkiem prawie 4-krotnie częściej występowały w drzewostanach sztucznych (15,6%). Większy udział drzew z symptomami obumierania gałęzi w dolnej, środkowej

oraz zarówno dolnej i środkowej części korony stwierdzono w drzewostanach pochodzenia naturalnego. W innych przypadkach lokalizacji martwych gałęzi w koronach przeważały drzewa z odnowień sztucznych (Tab. 7). Przerzedzenie koron drzew w stopniu do 25% stanu ulistnienia występowało najczęściej w odnowieniach naturalnych (82,4%). W pozostałych stopniach większy był udział jesionów odnowionych sztucznie (Tab. 8).

W młodych drzewostanach objęto analizą drzewa na trzech siedliskach: BMw, Lśw i Lw, przy czym najliczniej analizowane drzewa rosły na siedlisku Lw. Na tym siedlisku największy był udział drzew martwych (20,1%). Na lesie świeżym nie stwierdzono drzew martwych, a na siedlisku BMw udział ten wynosił 6,0%. Najczęściej jesiony żywe bez objawów nekroz występowały na lesie świeżym (95,0%), natomiast rzadziej takie drzewa pojawiały się na siedliskach lasu wilgotnego (37,6%) i boru mieszanego wilgotnego (38,0%) (Tab. 2). Objawy nekroz lokalnych zabliźnionych na pędach były obserwowane w największym stopniu na BMw (48,0% drzew). Na siedliskach BMw i Lśw nie wystąpiły symptomy zamierania pędu kilkanaście centymetrów poniżej szczytu oraz wycieki śluzu. Ponadto na lesie świeżym nie było drzew z nekrozami lokalnymi niezabliźnionymi, a na siedlisku BMw nie stwierdzono jesionów z martwymi wierzchołkami (Tab. 3). Najwięcej jesionów z martwymi gałęziami (30,5%) i z martwymi szczytami gałęzi (24,3%) stwierdzono na siedlisku Lw, a następnie na siedlisku BMw. Objawów chorobowych tego typu na gałęziach nie zaobserwowano u drzew na lesie świeżym (Tab. 4).

Martwe szczyty gałęzi o nasileniu od 6 do 25% częściej występowały u drzew na borze mieszanym wilgotnym (10,0%), natomiast w pozostałych stopniach nasilenia najwięcej było drzew na lesie wilgotnym (Tab. 5).

W drzewostanach powyżej 20 lat badania terenowe prowadzono w 13 drzewostanach na 4 typach siedliskowych lasu: Lśw, LMśw, Olj i Lw. Na siedlisku Olj w największy udział miały jesiony z objawami „wilków" na pniu (72,0%), nekroz lokalnych zabliźnionych (80,0%), nekroz lokalnych niezabliźnionych (28,0%), nekroz podłużnych z odsłoniętym drewnem (20,0%) oraz raków drzewnych (8,0%). U jesionów na LMśw pojawiały się najczęściej tafelkowate płytkie spękania kory (82,0%), oraz nekrozy podłużne z przyległą korą (66,0%). Na siedlisku lasu świeżego objawy nekroz podłużnych i nekroz lokalnych niezabliźnionych występowały najrzadziej. Drzewa martwe zaobserwowano jedynie w drzewostanach na siedlisku lasu wilgotnego (Tab. 6). Największe nasilenie zamierania gałęzi, obejmujące ponad 50% korony stwierdzono u drzew na siedlisku LMśw i Lw (Tab. 7). Na tych samych siedliskach najczęściej dochodziło do zamierania wierzchołka. Na lesie mieszanym świeżym najczęściej u drzew zamierały gałęzie w obrębie całej korony (32,0%). Najwięcej martwych gałęzi w dolnej części korony posiadały jesiony rosnące na

olsie jesionowym (60,0%). Stopień przerzedzenia koron przekraczający 75% stwierdzono u 4 drzew (8,0%) rosnących na siedlisku LMśw, zaś ubytek obejmujący do 25% stanu ulistnienia wystąpił u wszystkich analizowanych jesionów na siedlisku Olj (Tab. 8).

W drzewostanach do 20 lat nekrozy lokalne zabliźnione najczęściej występowały po południowej stronie pędu (27,9%), w mniejszym udziale stwierdzane były z północnej strony (21,7%), a najrzadziej na południowo-zachodniej stronie pędu głównego (5,1%) (Tab. 9).Udział drzew z lokalizacją nekroz lokalnych niezabliźnionych na pędach przedstawiał się podobnie jak nekroz zabliźnionych z tym, że najrzadziej były one usytuowane po południowo-wschodniej stronie świata (5,4%) i objawy te nie wystąpiły na północno-wschodniej stronie pędów. Południowa strona świata była dominującą w zakresie lokalizacji nekroz lokalnych zabliźnionych (25,6%) u drzew w wieku powyżej 20 lat. Nekrozy lokalne niezabliźnione u takich drzew najczęściej zlokalizowane były po północnej (27,0%) i wschodniej stronie pni (27,0%) (Tab. 9).

Nadleśnictwo Łosie (RDLP Kraków)

Teren Nadleśnictwa Łosie ma charakter gór średnich (wysokość nad poziom morza waha się od 320 do 997 m). Wyróżnia się tu dwa piętra klimatyczno – roślinne: - piętro pogórza, do 550 m n. p. m. oraz piętro dolnoreglowe, od 550 do prawie 1000 m n.p.m. Szkodliwe czynniki klimatyczne, które występują na tym terenie to szadź i okiść, szczególnie dotkliwe w południowej części Nadleśnictwa, a także przymrozki późne. Prawie cały obszar Nadleśnictwa Łosie zajmuje las górski (99,8%), a pozostałe tereny las łęgowy górski (0,2%). Gatunkiem dominującym jest buk, który zajmuje 30,1% powierzchni leśnej. Gatunkami o znacznym udziale są jodła (28,8% powierzchni leśnej) i sosna (27,2% powierzchni).

Badaniami objęto 30 drzewostanów, z których 14 było pochodzenia naturalnego oraz 16 pochodzenia sztucznego. W każdym drzewostanie analizowano 30, 50 lub 100 drzew rosnących obok siebie. Łącznie przeanalizowanych zostało 1110 drzew. Drzewostany objęte badaniami terenowymi były w wieku od 5 do 65 lat. Zostały one podzielone na 6 klas wiekowych: do 5 lat, 6 do 20 lat, 21 do 40 lat, 41 – 60 lat, oraz powyżej 60 lat (Tab. 10). Drzewostany do analizy zostały wybrane losowo na podstawie operatu urządzeniowego, uwzględniono: drzewostany z udziałem jesionu (zmieszanie pojedyncze, grupowe, kępowe), pochodzenie drzewostanów (naturalne, sztuczne) oraz wiek drzewostanów (ze szczególnym uwzględnieniem drzewostanów I klasy wieku).

W trakcie badań terenowych w Nadleśnictwie Łosie, wśród 1110 drzew stwierdzono 340 (30,6%) drzew martwych, 739 (66,6%) drzew żywych z objawami chorobowymi, oraz 31 (2,8%) drzew żywych bez objawów chorobowych (Tab. 11). Na pniach i pędach głównych jesionu wyniosłego stwierdzono następujące objawy chorobowe: lokalne podłużne spękania kory, tafelkowate spękania kory, nekrozy koliste gładkie, nekrozy lokalne zabliźnione, nekrozy lokalne niezabliźnione, rak otwarty, rak zamknięty i rakowata rana (z odsłoniętym drewnem, częściowo zabliźniona). Najczęstszymi objawami na pniach i pędach badanych jesionów były lokalne nekrozy zabliźnione, które wystąpiły na 264 (23,8%) drzewach, oraz nekrozy lokalne niezabliźnione, na 176 (15,9%) drzewach. Częstym objawem były również lokalne podłużne spękania kory, które wystąpiły na 148 drzewach (13,3%). Tafelkowate spękania kory stwierdzono na 29 (2,6%) drzewach, rakowate rany na 53 (4,8%) drzewach, zaś nekrozy koliste gładkie na 34 (3,1%) drzewach. Stosunkowo rzadko występowały raki otwarte, na 23 (2,1%) drzewach oraz raki zamknięte, na 14 (1,3%) drzewach (Tab. 11). Częstym objawem występującym u chorych jesionów było zamieranie gałęzi w koronach drzew. W badanych drzewostanach martwe gałęzie były obecne na 467(42,1%) drzewach. Najwięcej było drzew, u których zamarło 11 – 25% gałęzi w koronie drzewa. Takie nasilenie stwierdzono na 134 (28,7%) drzewach. Najmniej było drzew, u których obumarło 51 – 75% gałęzi w koronie – 65 (13,9%) drzew, oraz powyżej 75 % martwych gałęzi – 34 (7,3%) drzewa (Tab. 12). Częstym objawem u chorych jesionów było również zamieranie szczytów gałęzi w koronach drzew oraz zamieranie wierzchołków drzew. Martwe wierzchołki drzew stwierdzono u 121 (10,9%) drzew, martwe szczyty pojedynczych gałęzi wystąpiły na 65 (5,9%) drzewach, natomiast martwe szczyty licznych gałęzi stwierdzono na 144 (13%) drzewach (Tab. 12).

Największa liczba drzew martwych została stwierdzona w drzewostanach w wieku powyżej 60 lat (36,7%) oraz w wieku od 6 do 20 lat (34,6%). Najmniej drzew martwych stwierdzono w drzewostanach w wieku do 5 lat (18,8%) (Tab. 13). Drzewa żywe bez objawów były najliczniejsze w drzewostanach w wieku 21 – 40 lat (4,6%), zaś drzewa żywe z objawami w drzewostanach w wieku do 5 lat (80%) (Tab. 13).

Najliczniejszymi objawami, jakie stwierdzono na pniach i pędach głównych drzew były nekrozy lokalne, które wystąpiły na 440 drzewach. Największy udział drzew z nekrozami zabliźnionymi stwierdzony został w drzewostanach w wieku od 6 do 20 lat, gdzie stwierdzono 137 (39,1%) takich drzew. Drzewa z nekrozami zabliźnionymi były najmniej liczne w drzewostanach w wieku do 5 lat (13,8%). Najwięcej drzew z nekrozami lokalnymi niezabliźnionymi stwierdzono w drzewostanach w wieku 6-20 lat (19,7%) oraz w wieku do 5 lat (18,8%). Najmniej drzew z takimi objawami było w drzewostanach w wieku 41 – 60 lat (12,3%) (Tab. 13). Lokalne podłużne spękanie kory obserwowane było najliczniej w drzewostanach w wieku 41 do 60 lat (20,0 %), oraz

w wieku 21 - 40 lat (19,1% drzew) (Tab. 13). Stosunkowo częstym objawem występującym na drzewach jesionu wyniosłego były rakowate rany. Objaw ten występował najliczniej na drzewach w wieku powyżej 60 lat (10,0% drzew). Raki drzewne stwierdzane były sporadycznie, wystąpiły najliczniej (6,0%) na drzewach w wieku powyżej 60 lat. Najwięcej drzew z tafelkowatymi spękaniami kory było w wieku 41 – 60 lat (6,7%) oraz powyżej 60 lat (6,7%). W drzewostanach I klasy wieku nie stwierdzono tego objawu. Drzewa z nekrozami kolistymi gładkimi były najliczniejsze w wieku 41 – 60 lat (4,3%) (Tab. 13).

Objaw obumierania gałęzi w koronach drzew *Fraxinus excelsior* obserwowany był we wszystkich przedziałach wiekowych. Najwięcej drzew z obumierającą koroną stwierdzono w drzewostanach w wieku od 6 do 20 lat (55,4%). Najmniej drzew z tym objawem było w wieku do 5 lat (28,8%). W drzewostanach w wieku do 5 lat najczęściej stwierdzano od 26 do 50% martwych gałęzi w koronie (8,8% drzew). W drzewostanach w wieku od 6 do 20 lat najwięcej było drzew posiadających od 11 do 25% martwych gałęzi w koronie. Najrzadziej wśród drzewostanów we wszystkich klasach wieku stwierdzono obumieranie gałęzi w przedziale powyżej 75% martwych gałęzi (Tab. 14). Martwy wierzchołek najliczniej występował na drzewach w wieku od 6 do 20 lat (20,9%), najmniej drzew z tym objawem wystąpiło w drzewostanach powyżej 60 lat. Objaw obumierania szczytów pojedynczych gałęzi był najliczniejszy na drzewach w wieku od 6 do 20 lat (7,7%). Najmniej drzew z tym objawem stwierdzono w drzewostanach w wieku powyżej 60 lat (3,3%). Natomiast najwięcej drzew z martwymi szczytami licznych gałęzi było w wieku powyżej 60 lat (23,3%), najmniej zaś w wieku do 5 lat (8,8%) (Tab. 14).

W drzewostanach pochodzenia naturalnego stwierdzono 70,5% drzew żywych z objawami chorobowymi oraz 27,4% drzew martwych. W drzewostanach pochodzenia sztucznego było odpowiednio 62,4% oraz 34,1% takich drzew (Tab. 13). Większość rodzajów objawów chorobowych na pędach głównych i pniach drzew liczniej stwierdzono na drzewach pochodzących z odnowienia sztucznego niż w drzewostanach pochodzenia naturalnego. Lokalne podłużne spękania kory w drzewostanach pochodzących z odnowienia sztucznego stwierdzono na 17% drzew, zaś w drzewostanach pochodzenia naturalnego - u 9,8% drzew. Nekrozy lokalne zabliźnione wystąpiły u 27,2% drzew z odnowienia sztucznego i u 20,5% drzew z odnowienia naturalnego. Nekrozy lokalne niezabliźnione na pniach wystąpiły u 18,3% drzew pochodzenia sztucznego oraz u 13,5% drzew pochodzących z odnowienia naturalnego. Rakowate rany stwierdzono na 31 (5,7%) drzewach pochodzących z odnowienia sztucznego, zaś w drzewostanach pochodzenia naturalnego wystąpiły na 22 (3,9%) drzewach. Także martwe gałęzie w koronach częściej występowały w drzewostanach pochodzenia sztucznego (47,4% drzew), niż w drzewostanach pochodzenia naturalnego (37,0%) (Tab. 14). Dotyczy to również zamierania wierzchołków. Martwe wierzchołki

w drzewostanach naturalnych wystąpiły na 45 (7,9%) drzewach, w drzewostanach pochodzenia sztucznego stwierdzono je na 76 (14,1%) drzewach (Tab. 14).

Najliczniej występującymi objawami na pniach jesionu wyniosłego były nekrozy lokalne zabliźnione, które wystąpiły na 264 drzewach. U największej liczby drzew nekrozy zabliźnione stwierdzono od strony północnej pnia (31,1% drzew z nekrozami). Liczne były również drzewa z nekrozami stwierdzonymi od strony wschodniej (11,7%) oraz południowej (11,4%). Najmniej stwierdzono drzew, u których nekrozy zabliźnione występowały od zachodniej strony pnia (5,7%). Nekrozy niezabliźnione wystąpiły na pniach 176 drzew. U największej liczby drzew nekrozy występowały od strony północnej pnia (25,6% drzew z nekrozami). Znaczna była także liczba drzew z nekrozami zlokalizowanymi od strony południowo - wschodniej (14,2%) oraz południowej strony pnia (13,6% drzew). Najmniej było drzew z nekrozami niezabliźnionymi występującymi od strony zachodniej (7,4%) oraz południowo – zachodniej (6,3%).

Nadleśnictwo Radymno, Nadleśnictwo Sieniawa (RDLP Krosno)

W Nadleśnictwie Radymno dominują siedliska lasowe, które obejmują powierzchnię 57,1%, oraz siedliska borowe, zajmujące 40,2% powierzchni. Gatunkiem panującym jest sosna (61% powierzchni), następnie dąb – 12%, olcha – 11%, i brzoza – 9%. Pozostałe gatunki: modrzew, świerk, buk, klon, lipa, jesion, grab, topola, osika i sporadycznie inne zajmują powierzchnię do 2 % i mają mniejsze znaczenie gospodarcze.

W Nadleśnictwie Sieniawa przeważają siedliska lasowe, które zajmują powierzchnię 81,0%, oraz siedliska borowe zajmujące 16,0%. Gatunkiem panującym w drzewostanach tego nadleśnictwa jest sosna zwyczajna występująca na 64,0% powierzchni, natomiast pozostałe gatunki zajmują odpowiednio dąb szypułkowy 12,1%, olcha czarna 8,9%, brzoza brodawkowata 5,1%, buk zwyczajny 3,6%, świerk pospolity 3,3% oraz Md, Jd, Js, Gb, Tp, Oś, Wb, Lp, zajmujące łącznie 3,0% powierzchni.

Badania w Nadleśnictwie Radymno przeprowadzono w 20 drzewostanach rosnących na siedlisku BMśw, Lśw i Lł oraz w Nadleśnictwie Sieniawa w 8 drzewostanach na siedlisku Lw, LMw oraz LMśw (Tab. 15). Badania prowadzone były w drzewostanach o różnym wieku, powstałych na drodze naturalnego odnowienia lub poprzez sadzenie. Ogółem, na terenie obu nadleśnictw analizie poddano 850 drzew (Tab. 15). Do analiz dotyczących wpływu sposobu odnowienia, dane w tabelach dotyczą jesionów z przedziału wiekowego 6-8 lat oraz 41-60 lat (Tab. 16, 18).

Wśród przeanalizowanych 850 drzew, 35,9 % było martwych (Tab. 16). Największy odsetek drzew martwych odnotowano u jesionów 16-20-letnich (72,0%) oraz w wieku do 5 lat (69,7%), zaś

najmniej w drzewostanach w przedziale 41-60 lat (26,7%) (Tab. 16). Nasilenie zamierania drzew w poszczególnych oddziałach było różne. W okresie badań najwięcej drzew martwych było w 3-letniej uprawie w oddz.272m na siedlisku Lśw (96,0%) oraz w 59-letnim drzewostanie w oddz. 288f na siedlisku Lł (76,0%), a najmniej (8,0%) w trzech drzewostanach: 275b-Lw, 43 lata; 289g-Lł, 44 lata; 86d-Lw, 59 lat (Tab. 17). Jak wynika z danych w tabeli 16, w porównywanych drzewostanach jesiony pochodzenia naturalnego wykazywały większe nasilenie zamierania niż jesiony w drzewostanach pochodzenia sztucznego. Relacja taka wystąpiła zarówno w drzewostanach w wieku 6-8 lat, jak i wieku 41-60 lat (Tab. 16). Zróżnicowane było również nasilenie zamierania na różnych jak i na takich samych siedliskach. Przykładowo, w 3-letnich drzewostanach na Lśw w oddz. 272m martwych było 96,0% drzew a w oddz. 273f – 32,0% (Tab. 17).

U 50,7% drzew żywych obecne były zamarłe gałęzie w koronie (Tab. 16, 17). U 12,4% drzew zamarło ponad ¾ gałęzi w koronie (Tab. 16). W dwóch analizowanych drzewostanach udział takich drzew wynosił 32,0% (Tab. 17). Nasilenie ważniejszych objawów chorobowych przedstawiało się następująco: na pniach 19,2% drzew występowały raki drzewne, na 4,9% pniach – lokalne spękania kory, na 1,8% pni – tafelkowate spękania kory oraz na 44,7% pni – lokalne nekrozy kory (Tab. 18). Na jednym pniu obecne były często zarówno nekrozy zabliźnione jak i nekrozy niezabliźnione. Nekrozy zabliźnione były obecne na 223 (26,2%) drzewach, przy czym u 21,7% było zabliźnionych mniej niż 25% obecnych nekroz, co wskazuje na proces ich ciągłego powstawania (Tab. 19). Jak wynika z danych w tabeli 19 udział drzew z nekrozami na pniach był bardzo zróżnicowany. Podczas gdy w jednych drzewostanach nieliczne osobniki wykazywały obecność tego symptomu, w innych drzewostanach nekrozy zabliźnione wystąpiły na pniach 44 do 58% drzew. Nekrozy niezabliźnione były obecne na pniach 18,5% drzew. Na 132 pniach było do 25,0% stanu nekroz niezabliźnionych (Tab. 20).

Nekrozy kory oraz zrakowacenia na pniach najczęściej występowały u drzew w wieku 6 do 20 lat (Tab. 18). U młodych drzew częściej występowały one w drzewostanach założonych sztucznie zaś u starszych – w drzewostanach pochodzenia naturalnego (Tab. 18). Nekrozy zabliźnione i niezabliźnione występowały na pniach i strzałkach względem wszystkich stron świata, o pewnej zwiększonej tendencji od strony N, E, i NE (Tab. 21, 22). Natomiast raki drzewne częściej pojawiały się na pniach od strony południowej (30,1%) oraz wschodniej (27,6%) (Tab. 23).

Analizę objawów chorobowych i ich nasilenia prowadzono również w odnowieniach naturalnych na innych, poza wymienionymi wyżej terenach. Analizowano między innymi odnowienia naturalne w Nadleśnictwach: Rymanów, Resko, Rokita, Gryfice i w otulinie

Ojcowskiego Parku Narodowego. U młodych jesionów stwierdzano: więdniecie liści, nekrozy szczytu pędu głównego oraz szczytów pędów bocznych, nekrozy lokalne na strzałkach i na pędach, nekrozy pojedynczych korzeni oraz nekrozę całkowitą osobników. Badania prowadzone w różnych okresach czasu pozwoliły na określenie następstwa symptomów chorobowych, a zatem wyróżnienie objawów chorobowych pierwotnych i wtórnych. Nekrozy lokalne na strzałkach najczęściej brały początek od nasad odgałęzień bocznych. Zamieranie szczytów pędów przeważnie brało początek kilkanaście centymetrów poniżej wierzchołka. Nekrozom towarzyszyło jasnobeżowe lub ciemnobrunatne, jednolite, względnie smugowate przebarwienie kory, nierzadko połączone z lokalnymi zapadnięciami i wzdłużnymi lub tafelkowatymi spękaniami kory odsłaniającymi drewno. Niekiedy były to nekrozy nie wzdłużne, lecz koliste. Można było obserwować, że przez pewien okres rozprzestrzenianie nekrozy w dół pędów zostało ograniczane w miejscach odgałęzień bocznych. U części egzemplarzy w tych miejscach nastąpiło ograniczenie dalszego postępu choroby. U większości egzemplarzy, po okresie zahamowania, nekroza postępowała dalej w dół pędu prowadząc do zamierania całych egzemplarzy. Odsetek zamarłych jesionów był różny. Przykładowo, w 2-4–letnich odnowieniach naturalnych w Nadl. Staszów wynosił do 2,0%, w badanych odnowieniach otuliny OPN dochodził do 80%. U obumarłych drzewek stosunkowo szybko dochodziło do zgnilizny korzeni. Oprócz grzybów podstawkowych często stwierdzano zwłaszcza w górnej części systemu korzeniowego grzyby z rodzaju *Phomopsis,* które najprawdopodobniej zasiedlały korzenie, po uprzednim rozwoju u podstawy strzałki. Początkowo podejmowano próby porównywania rodzaju objawów chorobowych i ich nasilenia u młodych jesionów zależnie od sposobu odnowienia, jednak w trakcie badań zaobserwowano duże zmiany w procesie zamierania młodych jesionów w wielu odnowieniach naturalnych w miarę upływu czasu. Na przykład, w Nadl. Rokita w 2-4-letnim odnowieniu naturalnym jesionu w oddz. 70b w 2008 r. nie dostrzegano objawów zamierania. Wiązano to początkowo z faktem bardzo dobrego stanu zdrowotnego macierzystego drzewostanu jesionowego, pod którym to odnowienie występowało. Dalsze badania wykazały jednak szybko pogarszający się stan zdrowotny tego odnowienia. W 2011 r. stwierdzono, że tylko 33,3% nie wykazywało symptomów chorobowych, a 46,7% osobników już obumarło. Należy nadmienić, iż w niektórych innych drzewostanach tego Nadleśnictwa, np. w oddz. 279Ac, odnowienie cechowało się dobrym stanem zdrowotnym i w trakcie kilkuletniego okresu obserwacji stan ten nie uległ znaczącemu pogorszeniu. Z kolei w oddz. 627a, oprócz objawów intensywnego zamierania odnowienia naturalnego jesionu, stwierdzono również zamieranie nalotu jaworu. Pobrany materiał wykazał liczne porażenie sytemu korzeniowego jaworu przez grzyb *Verticillium* sp., natomiast w korzeniach jesionów nie stwierdzono obecności grzybów potencjalnie odpowiedzialnych za zamieranie tego gatunku.

Analizę objawów chorobowych, a cześciowo także ich nasilenia prowadzono również w szkółkach leśnych. Analiza sadzonek była prowadzona początkowo w szkółce w Nadleśnictwie Włoszczowa i Niepołomice, a następnie w Nadleśnictwie Stary Sącz i Rokita, gdzie po uzyskaniu zgody zwierzchnich władz, na bardzo ograniczonej powierzchni kontynuowano hodowlę jesionu dla potrzeb badawczych. Objawy chorobowe u sadzonek w szkółkach leśnych były zbieżne z tymi, które obserwowano w odnowieniach naturalnych i sztucznych. W trakcie oceny sadzonek w szkółce w Nadl. Stary Sącz, w 2008 roku na początku okresu wegetacyjnego udział osobników martwych wynosił, zależnie od kwatery od 8 do 13%, a objawy chorobowe w postaci nekroz lokalnych i nekroz szczytów pędów wystąpiły u 31do 38% sadzonek. W ciągu okresu wegetacyjnego zamarły przede wszystkim sadzonki najniższe. Na zamarłych wcześniej i pozostawionych na kwaterach, pojawiały się dodatkowe objawy w postaci czernienia powierzchni strzałki. Objawów takich nie obserwowano wcześniej w analizowanych drzewostanach. Dopiero w następnym okresie obecność ich stwierdzono również u obumarłych jesionów w nalotach w otulinie Ojcowskiego PN. Innym objawem, który zaobserwowano w tej szkółce, były lokalne nekrozy na blaszkach liściowych prowadzące do przedwczesnego obumierania całych pojedynczych listków. Nekrozom tym towarzyszyło szaroczarne przebarwienie tkanek. Analiza wykazała, że były to objawy związane z porażeniem przez *Venturia fraxini*. Badano również symptomy chorobowe w postaci nekroz pędów oraz ich sprawców w odniesieniu do innych gatunków drzew i krzewów, które rosnąc w sąsiedztwie jesionów zaczęły wykazywać objawy podobne do tych, jakie występują u jesionów. Uwzględniono *Acer pseudoplatanus*, *Forsythia* i *Ligustrum vulgare*. Grzyby izolowano na pożywkę po zastosowaniu dezynfekcji powierzchniowej stosowanej w odniesieniu do jesionów. W okresie badań nie stwierdzono by *Chalara fraxinea* infekował pędy innych gatunków drzew, poza jesionem. Analiza stanu jesionu w szkółce w Nadl. Rokita w trakcie drugiego okresu wegetacyjnego wykazała brak makroskopowych symptomów zamierania pędów u 71,5% siewek. Objawy nekroz pędu głównego i/lub pędów bocznych obserwowano u 24,0% siewek oraz nekrozę całkowitą 4,5% siewek. Wyniki mikologicznej analizy sadzonek jesionu w szkółkach przedstawiono w tabeli 35.

Należy wskazać, że częstymi objawami u jesionów w szkółkach, podobnie jak w nowo założonych uprawach doświadczalnych były nekrozy na liściach (Ryc. 42-44, 46-47). Nekroza lokalna na nerwie głównym prowadziła do zamierania szczytowej części położonej powyżej nekrozy.

4. Etiologiczne aspekty procesu zamierania jesionów

Dla określenia sprawców różnych typów symptomów chorobowych u jesionu prowadzono mikologiczną analizę tych organów drzew, które wykazywały objawy chorobowe. Część pobranego materiału przeznaczono do analizy mikologicznej na podstawie wytworzonych w naturze owocników. Część zaś, obejmującą zwłaszcza próbki bez wykształconych owocników przeznaczono do izolacji grzybni na pożywkę, głównie agarowo-maltozową oraz dla analizy wybranych cech morfologicznych grzybów, na pożywkę glukozowo-ziemniaczaną. Przed izolacją dokonywano szczegółowego opisu zewnętrznych i wewnętrznych objawów chorobowych. Dezynfekcji próbek pobranych z pędów lub innych organów dokonywano poprzez ich zanurzenie najpierw w 96% alkoholu etylowym /1 min/, a następnie w 4% podchlorynie sodu /5 min/ i w 96% alkoholu etylowym /0.5 min/. Po ich osuszeniu w sterylnej bibule filtracyjnej i ścięciu wierzchniej warstewki kory, wycinano fragmenty o wymiarach 5 x 2 x 2 mm i wykładano na pożywkę zestaloną w płytkach Petriego. Jeżeli proces chorobowy był bardziej zaawansowany, a zwłaszcza gdy były wytworzone owocniki grzybów dezynfekcji powierzchniowej dokonywano przy pomocy waty zwilżonej w alkoholu, po czym ścinano wysterylizowanym skalpelem wierzchnie warstwy kory lub drewna, a następnie ze świeżo odsłoniętych tkanek pobierano fragmenty i wykładano je na pożywkę. Z jednego pędu do izolacji wycinano najczęściej 6, sporadycznie 12 i więcej fragmentów. Wyrastające kolonie odszczepiano i inkubowano w temperaturze 20^{o}C. Celem wyjaśnienia pewnych aspektów choroby pojawiajacych się w trakcie badań dokonywano wielu wycinkowych badań tego procesu oraz prowadzono wiele wariantów doświadczeń, by móc wyciągać pewne wnioski odnośnie kierunków dalszych analiz. Celem uchwycenia sukcesji grzybów w nekrotycznych tkankach określano stadium zaawansowania choroby u danego jesionu (stadium początkowe i zaawansowane). Dla zbadania możliwości zasiedlania przez *Ch. fraxinea* różnych typów tkanek, z części pędów ze stadium początkowym nekroz wykonywano odrębnie izolacje z kory i drewna. Celem stwierdzenia możliwości zasiedlania żywych tkanek jesionu przez grzyby endofityczne, izolacje wykonywano także z tkanek jesionów nie wykazujących objawów chorobowych. Ogółem wykonano izolacje grzybów z ponad 10 tysięcy fragmentów kory i drewna pobranych z około 1700 pedów oraz zidentyfikowano grzyby na podstawie owocników wytworzonych na ponad 650 pędach.

Na ustalenie głównego nurtu badań w zakresie etiologii miał wpływ fakt, że autor od początku analizy stwierdzał szczególnie licznie w nekrotycznych tkankach pewien gatunek grzyba, który na podstawie cech morfologicznych zaklasyfikował do rodzaju *Chalara* (Kowalski 2001). Dalsze badania taksonomiczne tuz przed rozpoczeciem obecnych badań wykazały, że grzyb ten nie może być przyporządkowany do żadnego z dotychczas znanych gatunków, w związku z czym został opisany jako nowy gatunek, o nazwie *Chalara fraxinea* T. Kowalski (Kowalski 2006).

By uzyskać odpowiedź, czy grzyb ten występuje lokalnie na danym obszarze, czy jest szeroko rozprzestrzeniony, dokonywano izolacji grzybów z próbek pochodzących z różnych rejonów Polski. Wyniki dotyczące *Chalara fraxinea,* uzyskane na podstawie izolacji z 7200 fragmentów pobranych z 1134 chorych i zamierających jesionów w 23 nadleśnictwach (8 Regionalnych Dyrekcji LP) i na obszarze 2 parków narodowych wykazały, że grzyb *Chalara fraxinea* jest pospolity na jesionach w całej Polsce. Został on wykazany na wszystkich terenach, w których pobierano do badań jesiony z objawami zamierania (Tab. 24). Częstość infekcji jesionów przez ten gatunek była stosunkowo duża. Ogółem grzyb *Ch. fraxinea* został wykazany w 52,7% pędów. Stwierdzono duże różnice w udziale pędów, z których został on wyizolowany, między poszczególnymi nadleśnictwami. Najrzadziej izolowano *Ch. fraxinea* z pędów jesionu pobranych w Nadl. Sieniawa (8,0% pędów), zaś najczęściej z pędów z Nadl. Starogard (100,0%). Podejmując próbę porównywania tych wyników należy mieć na uwadze różny okres badań oraz różny stan zaawansowania procesu chorobowego badanych jesionów. Z przeprowadzonego doświadczenia porównawczego wynika, że częstość izolacji *Ch. fraxinea* była prawie trzykrotnie większa, gdy pędy jesionu wykazywały nekrozę w początkowym stadium, niż z pędów całkowicie obumarłych, pobieranych do badań głównie w okresie późnojesiennym. Jednym z powodów takiej sytuacji było zasiedlenie zamarłych tkanek przez inne gatunki grzybów, zwłaszcza z rodzaju *Alternaria, Cladosporium, Cytospora, Epicoccum* i *Phomopsis* (Fot.31-32). Grzyby te wykazują szybki wzrost na pożywce agarowo-maltozowej, uniemożliwiając jednocześnie rozwój wolno rosnącej grzybni *Ch. fraxinea.* Ogółem, spośród 7200 fragmentów pędów jesionów wziętych do analizy, grzybnia *Ch. fraxinea* wyrosła z 38,8% fragmentów (Tab. 24).

Przeprowadzone badania wykazały, że grzyb *Ch. fraxinea* po dokonaniu infekcji pędów jesionu może rozwijać się zarówno w korze, jak i w drewnie. Przeciętna częstość rozwoju w obu typach tkanek była dosyć zbliżona (kora 48,8%, drewno 52,2%), co wskazuje na brak wyraźnej preferencji w odniesieniu do jednego z tych typów tkanek. Sposób zasiedlania poszczególnych pędów może być różny. W ramach analizowanej próby, tylko w przypadku 37,7% pędów, *Ch. fraxinea* został wyizolowany zarówno z kory jak i drewna, w pozostałych pędach został stwierdzony tylko w jednej z tych tkanek.

Grzyb *Ch. fraxinea* może infekować drzewa we wszystkich klasach wieku. Jednak wielokrotnie częściej jest wykazywany w szkółkach i drzewostanach pierwszej klasy wieku. Cechuje go także zdolność infekcji różnych organów roślinnych. Jego obecność wykazana została w korzeniach, pędach i liściach. Częstość infekcji poszczególnych organów wykazuje jednak duże zróżnicowanie. Najczęściej infekowane są pędy główne i gałęzie boczne, gdzie dochodzi do

powstawania nekroz lokalnych lub, w przypadku rozszerzania się nekroz, do zamierania wierzchołków lub całych nadziemnych części.

Dokonywano identyfikacji także innych gatunków grzybów na pędach i fragmentach gałęzi oraz fragmentach pni na podstawie wytworzonych w naturze owocników lub takich form zarodnikowania, które umożliwiły identyfikację grzybów. Część tych wyników podano w tabeli 25 i 26, część w rozdziale dotyczącym nowo założonych upraw doświadczalnych. Z wykazu grzybów zidentyfikowanych na podstawie wytworzonych w naturze owocników na strzałkach i gałęziach jesionów pobranych z terenu trzech nadleśnictw wynika, że na 445 pędach stwierdzono występowanie owocników 42 gatunków grzybów. Dane te wskazują także, że mimo stosunkowo dużego zróżnicowania gatunkowego grzybów, tylko nieliczne cechują się dużą częstotliwością występowania. Na więcej niż 10% obumarłych częściach strzałek lub gałęzi jesionów występowało tylko pięć z nich. Były to grzyby: *Cytospora pruinosa* (37,1%), *Botryosphaeria stevensii* (32,4%), *Phomopsis scobina* (24,3%), *Massaria* sp. (13,9%) i *Diplodia* sp. (11,7%). Częściej stwierdzano także *Phomopsis controversa, Diaporthe* sp., *Phomopsis* sp., *Didymosphaeria acerina i Nectria galligena* (Tab. 25). Część z tych gatunków częściej stwierdzano w powiązaniu z określonymi objawami chorobowymi. Grzyby z rodzaju *Phomopsis* owocnikowały głównie w obrębie lokalnych nekroz wokół nasad gałęzi, ich owocniki pojawiały się stosunkowo wcześnie na brunatniejącej korze zanim doszło do odsłonięcia drewna. W tej początkowej fazie pojawiały się częściej zarodniki typu B niż zarodniki typu A tego gatunku. W nielicznych przypadkach na obumarłej korze stwierdzano otocznie w podkładkach *Diaporthe*, grzyba który jest stadium teleomorficznym *Phomopsis* sp. Grzyb *Cytospora pruinosa* wytwarzał pyknidy zarówno na szczytach pędów jak i na odcinkach pędów między węzłami. Podczas gdy obraz mikroskopowy pyknid, nie różnił się istotnie od występującego na różnych drzewach liściastych *Cytospora ambiens*, nieco inaczej przedstawiała się struktura kolonii, a zwłaszcza zdecydowaną różnice wykazywały trzonki konidialne, które były wielokrotnie drzewkowato rozgałęzione i osiągały do 45 mikrometrów długości. Nie stwierdzono natomiast na badanych jesionach występowania stadium teleomorficznego z rodzaju *Valsa.* Grzyb *Nectria galligena* wytwarzał charakterystyczne czerwone otocznie w obrębie rakowatych ran, którym towarzyszyły hipertrofie tkanek. *Nectria galligena* stwierdzano nie tylko na młodych jesionach, ale także na pniach ponad 60-letnich jesionów w obrębie rozległych hipertrofii na pniach i grubych gałęziach. Godne podkreślenia jest, że w obrębie nekrotycznych tkanek stwierdzano także

Chalara fraxinea. Wytwarzał on ciemno zabarwione utwory sklerenchymatyczne, a na nich fialidy ze skupieniami konidiów na szczycie fialid. Jak wynika z danych w tabeli 25 nie było to zjawisko powszechne. Obecność zarodnikowania tego gatunku stwierdzano w przypadku nekroz lokalnych z odsłoniętym drewnem. Grzyb *Botryosphaeria stevensii* tylko sporadycznie wytwarzał stadium teleomorficzne, głównie stwierdzano stadium anamorficzne, znane pod nazwą *Diplodia mutila*.

Dla identyfikacji grzybów w tkankach we wczesnych stadiach zamierania, w obrębie których nie wytworzyły się owocniki grzybów, oraz z drewna, wykonywano izolacje na pożywkę agarowo-maltozową. Po dezynfekcji powierzchniowej, fragmenty tkanek do izolacji pobierano zarówno ze stref środkowych jak i z pogranicza między tkankami zamierającymi bądź martwymi a żywymi. Dla tych samych trzech nadleśnictw wyniki podano w tabeli 26. Zróżnicowanie gatunkowe wyizolowanych w ten sposób grzybów przedstawiało się nieco inaczej niż w przypadku grzybów identyfikowanych na podstawie wytworzonych w naturze owocników, przy czym najpospolitsze gatunki wykryte zostały w efekcie obu metod identyfikacji, z wyjątkiem grzyba *Chalara fraxinea*. Poprzez izolacje z chorych tkanek zidentyfikowano 25 gatunków grzybów oraz wyróżniono kultury nie zarodnikujące grzybów. Najczęściej izolowanym gatunkiem grzyba była *Chalara fraxinea* (24,9%). Do częstych należały także: *Alternaria alternata, Phomopsis scobina, Phomopsis* sp.,*Cytospora pruinosa, Diplodia mutila* i *Fusarium* spp. Na szczególną uwagę zasługuje bardzo częste izolowanie z pędów w początkowym etapie zamierania grzyba *Chalara fraxinea*. Obserwowana jest niezwykle duża rozbieżność pomiędzy stosunkowo rzadkim stwierdzaniem tego gatunku na bazie zarodnikowania wytwarzanego na zamarłych pędach w naturze, a jego dużą częstotliwością izolacji z chorych tkanek na pożywkę. Wykonane izolacje z tkanek jesionów bez objawów chorobowych, celem stwierdzenia składu grzybów endofitycznych wykazały, że w tkankach takich nie występuje *Chalara fraxinea*, zaś najczęstsze są grzyby z rodzaju *Phomopsis,* a także *Alternaria alternata* i *Aureobasidium pullulans*. Ma to duże znaczenie w interpretacji roli *Chalara fraxinea* i określenia jej możliwości infekcji żywych jesionów i powodowania ich choroby.

W jednym z doświadczeń porównano wyniki izolacji grzybów z nekroz na 220 strzałkach kilkuletnich jesionów rosnących w nieznacznej odległości w podobnych warunkach siedliskowych, ale różniących się sposobem odnowienia Z każdej nekrozy pobrano 6 fragmentów kory i drewna (ogółem 1320 fragmentów). Analiza wykazała, że liczby wyizolowanych kolonii były bardzo zbliżone (678 oraz 693 kolonie), zbliżony był również skład gatunkowy grzybów zasiedlajacych takie jesiony (Tab. 27). Zaznaczały się natomiast różnice w częstości ich występowania. Najbardziej rzuca się w oczy, prawie dwukrotnie większy udział w otrzymanej populacji grzyba *Ch.*

fraxinea w przypadku jesionów z odnowienia naturalnego. Podobną relację można zaobserwować w odniesieniu do *Fusarium* sp.1. Natomiast identyczny był udział w obu populacjach grzyba *Phomopsis* sp.1, najczęstszego gatunku w obu wyizolowanych populacjach (Tab. 27).

W odniesieniu do przedstawionych wyżej wyników badań należy wskazać na konieczność przeprowadzania nierzadko dodatkowych badań laboratoryjnych. W badaniach nad mykobiota w powiązaniu z objawami chorobowymi, niezależnie od rodzaju choroby i gatunku drzewa dotkniętego chorobą pojawia się bowiem problem właściwej identyfikacji grzybów. Jest to związane z dużym zróżnicowaniem stadiów rozwojowych, w których może rozwijać się stadium wegetatywne lub generatywne jak i dużym zróżnicowaniem w obrębie struktury i barwy kolonii grzybów, które zależą m.in. od rodzaju pożywki, temperatury inkubacji, ale są też wynikiem zmienności genetycznej. Kultury wielu gatunków grzybów izolowane na pożywkę cechują się pewnym zakresem zmienności, który w przypadku nowo izolowanego gatunku musi być szczegółowo rozpoznany, by mimo różnic morfologicznych kultur były przypisywane danemu gatunkowi grzyba. Wiele gatunków grzybów nie tworzy jednolitych kolonii lecz sektory o zróżnicowanej barwie i strukturze grzybni powietrznej. Utworzone na bazie tych sektorów subkultury dają nierzadko inne morfotypy danego gatunku grzyba, które utrudniają identyfikację. Mając na uwadze powyższe uwarunkowania wyizolowane z różnych tkanek jesionów kultury grzybów (pędy, liście, korzenie, kora, drewno) poddawano hodowli w znormalizowanych, ściśle określonych warunkach laboratoryjnych. W przypadku grzybów wyizolowanych z jesionu powyższe badania porównawcze były konieczne zwłaszcza dla *Chalara fraxinea*, *Phomopsis* spp. i *Diplodia mutila*, przy czym konieczność taka w odniesieniu do każdego z nich była spowodowana innym czynnikiem. I tak, *Ch. fraxinea* jest gatunkiem, który został nowo opisany w 2006 roku. Nie dysponowano więc, realizując obecne badania, żadnymi danymi literaturowymi. Kultury izolowane z pędów, liści i korzeni wykazywały duże zróżnicowanie morfologiczne. W zakresie barwy były to kultury od bezbarwnych (przejrzystych) poprzez białe, rdzawe do ciemnobrunatnych ale także białawo-szare i oliwkowo-szare, co zależało między innymi od pojawu fialid. W zakresie struktury można było stwierdzać kultury wytwarzające i nie wytwarzające sklerotycznych czarnych utworów. Przeprowadzenie wielu hodowli o różnych kombinacjach pozwoliło określić zakres zmienności, i częściowo jej uwarunkowania, a następnie ustalenie ich przynależności do tego samego gatunku grzyba. Prawidłowość identyfikacji została poparta następnie badaniami genetycznymi, które umożliwiły także określenie zakresu zmienności. Z kolei problem przy identyfikacji *Diplodia mutila* wynika z braku wytwarzania zarodników w kulturach in vitro, a tym samym konieczności identyfikacji po grzybni wegetatywnej. Natomiast w przypadku grzybów z rodzaju *Phomopsis* wytwarzane mogą być w jednej kulturze różne typy zarodników (typ A, typ B, typ C) lub tylko

niektóre z nich, a przy tym różnice między poszczególnymi gatunkami z tego rodzaju są minimalne, co dotyczy gatunków izolowanych z jesionów jak i innych gatunków drzew i krzewów. Odrębny kierunek badań laboratoryjnych dotyczący identyfikacji grzybów na podstawie kultur in vitro, w których w większości przypadków wytwarzane jest tylko stadium wegetatywne, polegał na szukaniu dla wyizolowanych gatunków grzybów odpowiadających im stadiów teleomorficznych. Na jesionach wykazujących objawy chorobowe odrębnie postępowano z zebranymi próbkami, na których w naturze wytworzyło się stadium telemorficzne grzybów workowych (*Ascomycota*). W przypadku stwierdzenia otoczni wykonywano rozmaz z zarodników workowych na pożywce, a kiełkujące zarodniki przenoszono do oddzielnych płytek Petriego z zestaloną pożywką agarowo-maltozową z dodatkiem antybiotyku, celem zahamowania namnażania bakterii. Uzyskane kultury wykorzystywano do porównań z kulturami wyizolowanymi z tkanek nekrotycznych jesionów. W przypadku stwierdzenia na naturalnym substracie miseczek, przyklejano je do wieczka przy pomocy wazeliny i obserwowano wysyp i kiełkowanie zarodników workowych, by z nich wyhodować kulturę do celów porównawczych. Tego typu postępowanie metodyczne umożliwiło określenie niektórych nieznanych dotychczas powiązań anamorfa - teleomorfa oraz identyfikację kultur nie zarodnikujących in vitro.

W obecnych badaniach poświęcono także uwagę czterem innym aspektom związanym z *Chalara fraxinea*: udziału *Ch. fraxinea* w powodowaniu chorób liści jesionów, rozwoju tego gatunku w obrębie chodników jeśniaka rdzawego oraz możliwości infekowania korzeni i możliwości endofitycznego trybu życia. Odnośnie grzybów w obrębie chodników jeśniaka pstrego, izolacje próbne wykonano z drewna wokół chodników na pniach obumarłych jesionów (miejsca wylęgu owadów) oraz z drewna i kory na pniach jesionów żywych w miejscach żeru uzupełniającego jeśniaka. Tylko w pierwszym z wymienionych miejsc stwierdzono sporadycznie *Ch. fraxinea*, a głównie izolowano *Cytospora* sp. oraz *Diplodia mutila*. Wskazuje to na minimalne możliwości przenoszenia grzyba *Ch. fraxinea* przez jeśniaka z drzew obumierających na żywe jesiony.

Jednym z celów izolacji grzybów z korzeni jesionu było zbadanie możliwości ich pierwotnej infekcji przez *Ch. fraxinea*, co jak wykazały badania dotychczasowe, jest zjawiskiem stosunkowo rzadkim. Izolacje z korzeni zamierających i martwych jesionów wykazały częste ich zasiedlanie przez grzyby z rodzaju *Armillaria*, które powodują intensywna białą zgniliznę, a przez to przyczyniają się do zwiększania szkód ze strony wiatru. Jakkolwiek częściej zjawisko takie obserwowano w starszych drzewostanach, również młode jesiony z objawami chorobowymi na nadziemnych częściach nierzadko zostają zasiedlone przez *Armillaria*, która przyspiesza proces obumierania jesionów. Korzenie jesionów infekowane były tylko sporadycznie przez *Chalara*

fraxinea. Takie przypadki obserwowano dotychczas tylko u kilkuletnich sadzonek, zwłaszcza w szkółkach, które były całkowicie obumarłe lub obumarł tylko korzeń, a nadziemna cześć była jeszcze żywa. Drewno korzeni zasiedlonych przez *Ch. fraxinea* wykazywało szarobrunatne przebarwienie. Odmienną sytuację stwierdzono lokalnie w 2010 roku. Wystąpiły wówczas przypadki objawów uwiądu jesionu (Ryc. 5,7) w sytuacjach, gdy w obrębie strzałki brak było nekroz lokalnych, miazga wykazywała objawy intensywnego zbrunatnienia, podczas gdy kora wewnętrzna była jeszcze żywa (Ryc. 10). Był to skutek infekcji w górnej partii systemu korzeniowego, gdzie występowały nekrozy i szarobrunatne przebarwienie drewna. Jeżeli tego typu objawy będą się dalej potwierdzały, może to wskazywać na wmywanie zarodników workowych do gleby i zdolność infekcji przez nie korzeni jesionów. Pojawowi tego typu objawów mogą sprzyjać długotrwałe deszcze w okresie letnim.

Jak wskazano w rozdziale dotyczącym typów objawów chorobowych w niektórych młodych drzewostanach jesionowych stosunkowo często na nerwach liściowych powstają brunatne, powtarzające się lub jednolite nekrozy, którym niekiedy towarzyszą przewężenia (Fot.1-4, 42-44, 46-47). Wykonane izolacje z nerwów liściowych będących w różnym stadium zaawansowania nekroz po uprzedniej dezynfekcji powierzchniowej tkanek potwierdziły możliwość częstych infekcji liści przez ten gatunek i powodowania nekroz.

W trakcie realizowanych badań nie stwierdzono, by *Ch. fraxinea* występowała jako endofit w żywych korzeniach, pędach lub liściach.

5. Sprawca zamierania jesionu i uwarunkowania jego rozwoju

Z przedstwionych wyżej danych wynika, że w zamierających tkankach jesionów można stwierdzić obecność kilkudziesięciu gatunków grzybów. Są wśród nich gatunki zdolne do powodowania nekroz, zwłaszcza w przypadku osłabienia drzew, jak i gatunki saprotroficzne oraz endofityczne. Z dotychczasowych ustaleń wynika, że za głównego sprawcę choroby jesionu należy uznać grzyb *Chalara fraxinea*. Wskazują na to przeprowadzone w trakcie obecnych badań wyniki testów na patogeniczność, potwierdzone w ostatnim okresie także takimi testami w innych krajach Europy, w Szwecji i w Austrii. Poczynione w ostatnich latach badania (autorskie oraz prowadzone we współpracy) pozwoliły zidentyfikować stadium generatywne tego gatunku, istotne zwłaszcza z tego względu, że ono odgrywa decydującą rolę w rozprzestrzenianiu choroby.

Ustalenia te stwarzają możliwość określenia czasowego i przestrzennego rozwoju tego patogenu. Aspekty taksonomiczne sprowadzają się do dwóch zasadniczych ustaleń:

1/ - *ustalenia w zakresie stadium anamorficznego (wegetatywnego).* Jak wyżej wskazano, stadium to zostało po raz pierwszy wyizolowane i opisane w Polsce, pod nazwą *Chalara fraxinea*. Gatunek ten można zidentyfikować na podstawie takich cech jak wykształcanie butelkowatego kształtu fialid o długości 24-37 µm długości oraz jednokomórkowych, bezbarwnych konidiów o wymiarach 3.2-4.0 x 2.0-2.5 µm. Fialidy i konidia wykształcają się *in vitro* częściej, jeżeli kolonie hodowane są w niższych temperaturach, np. w zakresie 5 do 15^{o}C, niż w temperaturach powyżej 20^{o}C. Na chorych i zamierających jesionach fialidy i konidia wytwarzane są stosunkowo rzadko. Można je obserwować niekiedy w obrębie nekroz, którym towarzyszy wykruszenie kory prowadzące do odsłonięcia drewna (Fot. 16). Ciemna sklerenchymatyczna grzybnia z fialidami i konidiami tworzy się począwszy od jesieni na nerwach głównych liści jesionu, które po opadzie zalegają na dnie drzewostanów. Dotychczas mimo prowadzonych prób, autor nie stwierdził, by konidia posiadały zdolność kiełkowania, co warunkuje możliwość dokonywania przez nie infekcji.

2/ - *ustalenie występowania stadium generatywnego.* Problem poświęcenia w badaniach dużo uwagi dla poszukiwania stadium teleomorficznego wynikał z faktu, że *Ch. fraxinea* jest grzybem anamorficznym (niedoskonałym), tzn. wytwarzającym zarodniki (konidia) na drodze wegetatywnej. Jednak, jak wyżej podano, w obrębie nekroz na pędach takie zarodniki można obserwować stosunkowo rzadko. Tworzą się one licznie w wyizolowanych z takich nekroz kulturach grzyba, zwłaszcza podczas hodowli w warunkach obniżonej temperatury. Nasuwało się więc podstawowe pytanie, w jaki sposób dochodzi do tak licznych infekcji jesionów w drzewostanach oraz w szkółkach? Postawiono hipotezę, że grzyb ten wytwarza również w naturze stadium teleomorficzne (generatywne), tzn. stadium rozwojowe, w którym wytwarza zarodniki na drodze płciowej. Rozpoczęto więc analizę zamarłych drzew oraz pędów żywych z lokalnymi nekrozami, z czasem także liści jesionu, z różnych rejonów kraju, pod kątem obecności owocników grzybów workowych. W przypadku ich stwierdzenia, starano się wyhodować z zarodników workowych kultury na pożywkach, dla celów porównawczych ze znanymi kulturami *Ch. fraxinea*. Owocniki, z których uzyskano kultury identyczne z *Ch. fraxinea* napotkał autor po raz pierwszy w sierpniu 2008 roku na terenie Nadl. Miechów. Zaskoczeniem było to, iż występowały one nie na pędach, lecz w ściole, na nerwach liści jesionu, które opadły w 2007 roku. Przeprowadzone następnie badania genetyczne doprowadziły do jednoznacznego stwierdzenia, że sekwencja DNA zarodników workowych wytworzonych w tych owocnikach jest identyczna z sekwencją DNA grzybni *Ch. fraxinea*. Grzyb w tym stadium został zaliczony do gatunku *Hymenoscyphus albidus* (Robergere ex Desm.) W. Philips (= pucharek jesionowy), który znany jest w Europie od 150 lat. Był wielokrotnie odnotowywany w różnych krajach Europy, lecz w herbariach są jedynie nielicznie zachowane

okazy. W żadnym muzeum kultur czystych, ani w Europie, ani w świecie, nie została zdeponowana kultura tego gatunku. Nigdy w przeszłości grzyb ten nie był wiązany z chorobą jesionu. W publikacjach i kluczach do oznaczania grzybów podawany był tylko jako saprotrof występujący na nerwach liściowych jesionu. Z kolei stadium wegetatywne tego grzyba nie było w ogóle znane, i jak wyżej wspomniano, zostało opisane przez autora w 2006 roku, przy jednoczesnym wskazaniu na jego dużą rolę w obserwowanym od kilkunastu lat procesie zamierania jesionu. Stwierdzone obecnie owocniki wykazywały pewne różnice w zakresie wymiarów zarodników i worków w porównaniu z danymi w literaturze, lecz różnice te nie upoważniały do opisu nowego gatunku. Fakt występowania *H. albidus* w Europie od ponad 150 lat, przy braku jakichkolwiek wcześniejszych symptomów jego patogeniczności w stosunku do jesionu spowodował stawianie nowych hipotez na temat przyczyn zamierania jesionu. Jedna z nich sugerowała, że doszło do zmian właściwości patogenicznych sprawcy wskutek hybrydyzacji lub mutacji, względnie do zawleczenia z odległego obszaru pokrewnego gatunku trudnego do odróżnienia od *H. albidus* na podstawie cech morfologicznych. Weryfikację tej hipotezy przeprowadził zespół z ETH w Zurychu we współpracy z Katedrą Fitopatologii Leśnej w Krakowie, w ramach badań wykraczajacych poza ramy obecnego tematu badawczego. Stało się to możliwe po zgromadzeniu kultur wyizolowanych z nekroz na strzałkach jesionów oraz z miseczek *Hymenoscyphus* z terenów, gdzie jesion zamiera oraz z terenów, gdzie jesion nie wykazuje objawów zamierania (takie obszary najbliżej można było zlokalizować w Alpach w Szwajcarii). Badaniami objęto także nieliczne okazy zidentyfikowane jako *Hymenoscyphus albidus,* występujące w herbarium w Zurychu. Stwierdzono, że miseczki *Hymenoscyphus* występują masowo na nerwach liściowych w całej Europie w rejonach zamierania jesionu. Natomiast w terenach, gdzie jesion nie zamiera, zdołano zebrać jedynie nieliczne nerwy liściowe jesionu z miseczkami *Hymenoscyphus*. Przeprowadzone badania porównawcze wykazały, że w obrębie występującej na jesionie populacji identyfikowanej dotychczs jako *Hymenoscyphus albidus* można wyróżnić dwie filogenetyczne podgrupy (Queloz i in. 2011). W efekcie tych badań zaproponowano dwie oddzielne nazwy dla populacji reprezentujących obydwie podgrupy. Populacji z terenów, gdzie jesion zamiera nadano nową nazwę gatunkową *Hymenoscyphus pseudoalbidus* (Queloz i in. 2011). Stadium anamorficznym tego nowo wyróżnionego workowca jest opisany w 2006 roku grzyb *Ch. fraxinea.* Dla populacji występującej na jesionach bez objawów zamierania aktualna została nazwa *H. albidus s. str*. Gatunek ten nie ma dotychczas przypisanego stadium wegetatywnego. Według dotychczasowego stanu wiedzy uważa się, że *H. albidus* nie wykazuje właściwości patogenicznych.

W trakcie obecnych badań nad zamieraniem jesionu na terenie Polski, ani z nekroz, ani z miseczek nie uzyskano kolonii *Hymenoscyphus albidus s. str.* Według nowej nomenklatury wszystkie kolonie i okazy miseczek z analizowanych terenów Polski odpowiadają populacji identyfikowanej obecnie jako *Hymenoscyphus pseudoalbidus* ze stadium konidialnym *Chalara fraxinea* (Kraj i in. 2011).

Wyniki analizy najważniejszych cech mikroskopowych *H. pseudoalbidus* z terenu sześciu nadleśnictw w Polsce w latach 2009 – 2010 przedstawiono w tabeli 28. Owocniki stadium workowego sprawcy mają postać miseczek o średnicy 1.5 do 3.0 (7.0) mm, wytworzonych ponad substratem na nóżce o dł. 0.4 – 2.0 mm, barwy białokremowej, w miarę starzenia i wysychania barwy cynamonowobrunatnej (Fot. 27-29). Worki cylindryczno – maczugowate, o wymiarach 80-107 x 8 – 10.0 μm. Zarodniki workowe wrzecionowato-eliptyczne, bezbarwne, proste lub lekko zagięte, osiągają wymiary 13 - 17(- 21) x 3.5 - 5 μm (Fot. 33-34). Zarodniki workowe są łatwo rozprzestrzeniane przez wiatr. Charakterystyczną cechą było także sczernienie tych fragmentów nerwów, z których wyrastały miseczki. Jest to wynikiem wytwarzania przez grzyb powierzchniowej sklerenchymatycznej grzybni.

Dokonane rozpoznanie stanowi znaczący postęp w zrozumieniu procesów związanych z zamieraniem jesionu. Cykl rozwojowy sprawcy zamierania jesionu przedstawia się następująco:

Miseczki wytwarzane są na ubiegłorocznych nerwach liściowych jesionu leżących na dnie drzewostanów, zasadniczo w okresie od początku lipca do końca września. Zależnie od układu warunków pogodowych, okres ten może ulegać pewnym wahaniom, miseczki można niekiedy spotkać już w trzeciej dekadzie czerwca, a także jeszcze w październiku. Miseczki na danym nerwie nie rozwijają się równocześnie, można stwierdzać obecność miseczek będących w różnym stadium rozwoju. Liczba miseczek na jednym nerwie jest różna. W 2010 roku maksymalnie na jednym nerwie stwierdzono 92 miseczki. Sporadycznie miseczki tworzą się na nasadowej części strzałek zamarłych sadzonek. W okresie pojawu miseczek następuje wyrzut zarodników workowych i ich rozprzestrzenianie przez wiatr. Zarodniki te dokonują infekcji: a) pędów głównych i gałęzi, powodując lokalne nekrozy kory i miazgi, oraz b) liści w koronach drzew, zwłaszcza w obrębie ich nerwu głównego, powodując lokalne nekrozy i zamieranie fragmentu szczytowego powyżej nekrozy, co prowadzi nierzadko do przedwczesnego opadu liści. Na opadłych na dno drzewostanów liściach, w okresie jesieni zasiedlone fragmenty nerwów głównych czernieją, co jest wynikiem tworzenia sklerenchymatycznej grzybni. Z grzybni tej wyrastają liczne fialidy na których szczycie zbierają się w postaci kropli konidia stadium anamorficznego, *Ch. fraxinea*. W miejscach tych w okresie letnim następnego roku nastąpi wykształcanie się miseczek.

Badania we wszystkich latach od chwili znalezienia związku pomiędzy *Chalara fraxinea* a jej stadium teleomorficznym, prowadzone każdorazowo w okresie od końca czerwca do początku października przeprowadzone w drzewostanach jesionowych w Nadleśnictwach: Włoszczowa, Miechów, Stary Sącz, Staszów, Andrychów, Gryfice, Rokita oraz na terenie Ojcowskiego i Tatrzańskiego PN wykazały, że we wszystkich drzewostanach, niezależnie od wieku, na ubiegłorocznych nerwach liściowych jesionu występowały miseczki *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, co wskazuje na ogromny rezerwuar materiału zakaźnego w obrębie ścioły w drzewostanach z udziałem jesionu (Fot. 27). Jedynie lokalnie, jeżeli podłoże jest mało wilgotne, zalega gruba warstwa liści innych gatunków (np. buka), przy słabo rozwiniętym runie, może przeważać udział nerwów liściowych jesionu w ściole, na których nie dochodzi do rozwoju miseczek. Na przykład wśród 14 drzewostanów analizowanych w Nadl. Rokita, stsosunkowo nieliczne wykształcanie miseczek obserwowano w oddz. 279Ac, 70b oraz 115a.

Wpływ temperatury na wzrost grzybów izolowanych z jesionu

W związku z tym, że problem zamierania jesionu o cechach obserwowanych od 1992 roku jest zjawiskiem w znacznym stopniu nowym, wcześniej nie wiązanym z określonymi gatunkami grzybów, gatunki obecnie izolowane z chorych i zamarłych tkanek są w zakresie pewnych właściwości fizjologiczno-rozwojowych mało znane. Dotyczy to między innymi możliwości wzrostu zależnie od temperatury. Badania przeprowadzono w warunkach in vitro na pożywce agarowo-maltozowej, poprzez ich hodowlę w następujących warunkach temperaturowych: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35^{o}C. Testy przeprowadzono z następującymi gatunkami grzybów: *Chalara fraxinea* - 30 kultur, *Phomopsis controversa* - 12 kultur, *Cytospora* cf. *pruinosa* - 6 kultur, *Fusarium lateritium* - 5 kultur oraz *Diplodia mutila* - 12 kultur.

Grzyby powyższe cechowała następująca możliwość wzrostu in vitro:

Chalara fraxinea - Jak wynika z danych w tej tabeli 29, *Chalara fraxinea* wykazywała najszybszy wzrost w temperaturze 20^{o}C, ale niewiele wolniejszy wzrost następował w temperaturze 15^{o}C i 25^{o}C, natomiast w temperaturze 30^{o}C wzrost promieniowy wszystkich szczepów uległ zahamowaniu, u pojedynczych szczepów pochodzących z Nadl. Gryfice, strzępki rozwijały się tylko na inokulum. Z podanych przykładów wynika, że tempo wzrostu *Chalara fraxinea*

cechowało się niezależnie od pochodzenia dużymi wahaniami. Niezależnie od różnic w tempie wzrostu wykazywały one również duże zróżnicowanie struktury i barwy zarówno w warunkach wzrostu w tej samej temperaturze jak i odmiennych temperaturach. Były przypadki, że dany szczep wykazywał inne cechy w temperaturach niższych, a inne w wyższych. W wielu przypadkach temperatury niskie sprzyjały zatracaniu barwy brunatnej i przyjmowaniu form hyalinowych. Zaznaczał się również wpływ temperatury na zarodnikowanie konidialne i wytwarzanie struktur sklerenchymatycznych. Sprzyjały temu procesowi niskie temperatury.

Phomopsis controversa - Po 7 dniach wzrost grzybni został odnotowany w temperaturach 10 do 30^{o}C. W temperaturze 5 i 35^{o}C wzrost ograniczał się do inokulum. W temperaturze 20 ^{o}C średnica kolonii wynosiła od 4.7 cm do 7.9 cm, w 25^{o}C - 5.8 do 9.0 cm, a w temp. 30^{o}C - 5.1 do 7.9 cm. Przeciętną średnicę największą osiągał w temperaturze 25 stopni.

Cytospora cf. *pruinosa* - Po czterech tygodniach wzrost kolonii zaobserwowano w temperaturach 5 do 35^{o}C, przy czym w skrajnych temperaturach był znikomy i wynosił 0.3 do 3.0 cm. Najszybciej kolonie tego gatunku wzrastały w temp. 30 ^{o}C, osiągając od 5.4 do 9.0 cm.

Fusarium cf. *lateritium* - Po 7 dniach wzrost kolonii zaobserwowano we wszystkich temperaturach hodowli optimum w 25^{o}C. W każdej temperaturze stwierdzano duże różnice w tempie wzrostu między szczepami. Przykładowo, w 30^{o}C osiągały one od 1.9 do 8.2 cm.

Diplodia mutila - Po 7 dniach wzrost kolonii zaobserwowano w temperaturach 10 do 35^{o}C, przy czym w najwyższej z nich, wzrost był ograniczony do inokulum. Optimum wzrostu dla tego gatunku wynosiło 25^{o}C. W temperaturze tej osiągał on średnicę 6.1 do 8.9 cm, podczas gdy w 20^{o}C - 4.9 do 6.7 cm. Kolonia tego gatunku cechuje się wytwarzaniem obfitej czarnej grzybni powietrznej. Zaobserwowano, że w temperaturze 35^{o}C kolonia zatraca melaninowy barwnik i pojawiają się strzępki białe. Strzępki białe przeniesione do niższych temperatur dawały początek koloniom ciemno zabarwionym, co wskazuje, że temperatura 35^{o}C nie powodowała utraty ich żywotności.

6. Badania nad patogenicznością *Chalara fraxinea*

W związku z częstym stwierdzaniem w pędach z objawami początkowymi nekroz tkanek nowo opisanego gatunku grzyba *Chalara fraxinea* o nieznanych właściwościach patogenicznych, w doświadczeniach nad sztuczną inokulacją jesionów główną uwagę poświęcono szczepom tego gatunku. Założono trzy warianty doświadczenia, które przedstawia tabela 30. Dokonano inokulacji 48 jesionów w wieku 3 - 5 lat, o wysokości 1.1 do 3.2 m. Dwanaście dalszych egzemplarzy służyło

jako kontrola (4 egzemplarze w każdym wariancie). Dla celów kontrolnych dokonano inokulacji pędów jesionów w miejsce zranienia, używając fragmentów nie porośniętych kulturą grzyba. Grubość pędów w miejscu infekcji wynosiła 0.6 do 4.2 cm. Warianty różniły się terminem inokulacji i okresem oceny nekroz od momentu inokulacji. Wariant I inokulacja - koniec czerwca 2005, ocena po dwóch miesiącach, wariant II inokulacja - koniec maja 2006, ocena po trzech miesiącach, wariant III inokulacja - koniec lipca 2006, ocena po dwunastu miesiącach (Tab. 30). Jako inokulum służyły fragmenty drewna jesionu (5x2x2 mm), które były po wysterylizowaniu przerośnięte grzybnią *Chalara fraxinea*. Wykorzystano dziesięć szczepów tego gatunku, wyizolowanych uprzednio z chorych jesionów w Nadl. Jędrzejów, Niepołomice, Miechów i Staszów (Tab. 30). Inokulum umieszczano w nacięcie kory (8 mm dł) pędu wykonane sterylnym skalpelem, po czym miejsce takie owijano parafilmem. Podczas oceny określano długość całkowitą nekrozy, oraz jej rozmiar powyżej i poniżej miejsca inokulacji. Reizolacji dokonywano w ciagu 24 godzin po pobraniu pędów na poletkach doświadczalnych. Pobierano fragmenty z 3 do 7 miejsc, zależnie od długosci nekrozy, z reguły z rejonu inokulacji, z przejścia między martwymi a żywymi tkankami, oraz z 1-2 miejsc pośrednich powyżej i poniżej nekrozy. Z jednego miejsca pobierano 3 lub 6 fragmentów. Dezynfekcja i sposób izolacji przebiegały według zasad izolacji z pędów we wczesnej fazie powstawania nekroz. Ogółem wyłożono na pożywkę 1330 fragmentów (Tab. 31). Z pędów kontrolnych, z rejonu każdej całkowicie lub częściowo zabliźnionej rany pobierano 6 fragmentów, ogółem 72 fragmenty.

Jak wynika z danych przedstawionych w tabeli 30 każdy z inokulowanych 48 jesionów wykazywał objawy chorobowe. Były to objawy należące do dwóch zasadniczych typów: A/ powstawały lokalne nekrozy (u 24 jesionów) oraz B/ dochodziło do zamierania zainokulowanych pędów (u 24 jesionów). Rodzaj symptomów zależał od czasu jaki upłynął od terminu inokulacji do oceny. Po upływie 2 - 3 miesięcy obumarło 29,6% pędów, po 12 miesiącach 76,2% pędów wykazywało takie symptomy (Tab. 30). Rodzaj symptomów zależał w pewnym stopniu od grubości pędów, a po części także od obecności odgałęzień bocznych. Zamarłe pędy miały średnicę 0.9 do 1.0 cm, zaś pędy z nekrozami 1.3 do 2.1 cm. Jednak były pędy o takiej samej średnicy, a wykazywały różne symptomy (pędy nr 1 i 6, nr 20 i 23, nr 35 i 47). Przeciętnie długość nekroz lokalnych w wariancie III była dwa razy większa niż w wariancie I i II. Jednak w każdym wariancie różnice w wielkości nekroz między poszczególnymi osobnikami były stosunkowo duże (Tab. 30). Nekrozy rozwijały się zawsze zarówno powyżej jak i poniżej miejsca inokulacji (Fot. 35-40). Jednak tylko wyjątkowo ich powstawanie w obu kierunkach było takie same. Przeciętnie we wszystkich wariantach nekrozy postępowały szybciej w dół od miejsca inokulacji. Różnica ta była najbardziej wyraźna w wariancie II, zaś najmniej w wariancie III. W pojedynczych przypadkach nekroza postępowała szybciej w

górę pędu (np. jesion nr 22, 29, 30, 35). W rozszerzaniu się nekroz pewną przeszkodą były węzły, tzn. miejsca odgałęzień bocznych. W tych miejscach dochodziło bowiem niekiedy do zahamowania postępu nekrozy, niekiedy ulegała zwężeniu, i dalej rozwijała się w postaci wąskiego pasemka. Rozszerzanie się nekrozy było niekiedy większe niż wskazywały na to zewnętrzne zmiany w postaci zbrunatnienia i zapadnięcia tkanek. Dochodziło do obumierania miazgi poza obrębem widocznej nekrozy, gdyż wewnętrzna kora pozostawała zielona.

Długość obumarłych pędów wynosiła od 28 do 158 cm. W takich sytuacjach w miejscach inokulacji brak było śladów procesów zabliźniania powstałej rany. W niektórych przypadkach obserwowano więdnięcie liści, mimo że znaczna część pędu była jeszcze żywa. U jesionu nr 5 taką sytuację obserwowano po 2 miesiącach. Na 25% pędach w miejscu rany i inokulacji dochodziło do czernienia powierzchni drewna, co miało związek z tworzeniem przez grzyb pseudoparenchymatycznej nibytkanki, na której wykształcały się pojedyncze fialidy sprawcy.

Spośród 12 jesionów, które służyły jako kontrola, po 2, 3 lub 12 miesiącach, poza jednym przypadkiem, rany były w pełni zabliźnione.

Spośród 48 inokulowanych jesionów, *Ch. fraxinea* została reizolowana z 41 osobników (Tab. 31). Tylko w wariancie I reizolowano ją ze wszystkich jesionów. *Ch. fraxinea* wyrosła z 26,8% fragmentów, spośród 1330 wyłożonych na pożywkę. Była ona izolowana także z odcinków dalece odległych od miejsca inokulacji. Na przykład u jesionu nr 34 wyizolowano ją z odległości 60 cm, a u jesionu nr 33 z odległości 90 cm powyżej miejsca inokulacji. Ogółem podczas procesu reizolacji otrzymano kolonie 24 gatunków oraz kolonie bakterii (Tab. 31). Najczęściej izolowano *Fusarium lateritium, Fusarium* sp., *Phomopsis* spp. i *Diplodia mutila*. Są to gatunki szybko rosnące i mogły utrudnić wyrastanie *Ch. fraxinea* na pożywkę. Podczas wzrostu wymienionych organizmów na pożywce obserwowano hamujący wpływ bakterii na *Ch. fraxinea* i inne gatunki grzybów. Z drzew kontrolnych *Ch. fraxinea* nie został wyizolowany.

Przeprowadzone doświadczenia wykazały patogeniczne właściwości *Ch. fraxinea*. Na inokulowanych jesionach wywołała ona identyczne symptomy do tych, jakie obserwowane są w naturalnych warunkach u jesionów wykazujących objawy zamierania. Badania te wykazały także obecność takich gatunków grzybów, jakie oprócz *Ch. fraxinea* najczęściej stwierdza się w nekrotycznych tkankach jesionów.

7. Badania fitopatologiczne w nowo założonych uprawach doświadczalnych

Całość terenowych badań fitopatologicznych prowadzona była na pięciu stałych powierzchniach doświadczalnych założonych celem długookresowej oceny podatności jesionów.

Powierzchnie te zostały założone przez Nadleśnictwa po uzgodnieniach z DGLP i odpowiednimi RDLP. Są to:

Powierzchnia nr 1 - Nadleśnictwo Stary Sącz, Leśnictwo Lipnica Wielka, oddz. 4a , siedlisko Las wyż.św., pow. 15 ar, 900 szt.

Powierzchnia nr 2 - Nadleśnictwo Stary Sącz, Leśnictwo Łososina Dolna, oddz. 84a, siedlisko Las górski św., pow. 10 ar, 600 szt.

Powierzchnia nr 3 - Nadleśnictwo Limanowa, Leśnictwo Kostrza, oddz. 42g, pow. 18 ar, 600 szt.

Powierzchnia nr 4 - Nadleśnictwo Rokita, Leśn. Moracz, oddz. 560k, siedlisko OlJ, grunt porolny, przygotowanie gleby - orka w pasy, 20 ar, 500 szt.

Powierzchnia nr 5 - Nadleśnictwo Rokita, Leśn. Samlino, oddz. 20f, siedlisko Lw, powierzchnia pozrębowa do odnowienia, przygotowanie gleby – orka w pasy, 30 ar, 500 szt.

Na powierzchniach 1 - 3 wysadzono wiosną 2008 r. sadzonki jesionu wyniosłego ze szkółki Kamieniec w Nadl. Stary Sącz, gdzie w kwietniu 2008 r. dokonano analizy stanu zdrowotnego sadzonek, zwracając uwagę zwłaszcza na typy objawów chorobowych w postaci lokalnych nekroz i zamierania szczytów pędów głównych i bocznych. Do wysadzenia na powierzchniach przeznaczone zostały sadzonki nie wykazujące żadnych makroskopowych objawów chorobowych.
Na powierzchniach 4 - 5 wysadzono wiosną 2010 r. sadzonki jesionu wyniosłego wyhodowane do tego celu w szkółce w Nadl. Rokita. Do wysadzenia przeznaczone zostały sadzonki nie wykazujące żadnych makroskopowych objawów chorobowych.

Nasilenie występowania objawów chorobowych u jesionów w nowo założonych uprawach doświadczalnych przedstawiono w tabeli 32. Z uwagi na różny okres wzrostu sadzonek od momentu wysadzenia na powierzchniach trudno dokonywać bezpośredniej oceny porównawczej w zakresie częstotliwości pojawu objawów chorobowych pomiędzy poszczególnymi powierzchniami, należy uwzględnić okres wzrostu sadzonek w uprawie. Takie różnice się jednak zarysowują i mogą mieć podłoże w obrębie rośliny gospodarza jak i w zróżnicowanej obecności rezerwuarów materiału zakaźnego w sąsiedztwie powierzchni. Z obserwacji wynika, że tempo całkowitego obumierania sadzonek po upływie jednego okresu wegetacyjnego nie było duże i wyniosło maksymalnie 12,0% (Tab. 32). Natomiast lokalnie dochodzi do częstego zamierania nadziemnej części przy żywym systemie korzeniowym, co skutkuje nierzadko wyrastaniem pędów odroślowych. Najbardziej zaznaczał się ten symptom po upływie jednego roku na powierzchni Nr 3 w Nadl. Limanowa (Tab. 32). To głównie on skutkował, że w tej uprawie tylko 19% sadzonek nie wykazywało żadnych makroskopowych objawów chorobowych, co znacznie odbiegało od stanu

stwierdzanego na innych powierzchniach. Obserwowane objawy w postaci martwych wierzchołków są przeważnie wynikiem lokalnych nekroz powstających w różnych miejscach na strzałkach, na ogół u nasady odgałęzień bocznych oraz miejsc usytuowania pączków (por. Fot. 13-16). Na wszystkich powierzchniach nekrozy lokalne charakteryzowały się w głównej mierze jasnym przebarwieniem kory i ciemnymi smugami, rzadziej były to przebarwienia jednolicie brunatne (Fot. 13-14).

W czasie obserwacji w 2012 roku sadzonki jesionu na powierzchni Nr 1 do 3 były oceniane po pięciu okresach wegetacyjnych, zaś na powierzchniach Nr 4 i 5 po trzech okresach wegetacyjnych. Należy ten fakt mieć na uwadze przy analizie stanu zdrowotnego sadzonek w 2012 roku, której wyniki przedstawiono w tabeli 32. Pomiędzy tymi powierzchniami istnieje zasadnicza różnica w stanie zdrowotnym sadzonek. W obrębie pierwszej grupy powierzchni, na terenie RDLP Kraków, jedynie 6,3 do 16,8% osobników nie wykazywało objawów chorobowych. Na powierzchniach w RDLP Szczecin było 36,2 do 57,2% takich osobników (Tab. 32). Wskazuje to na dużo lepszy stan zdrowotny dwóch młodszych upraw. Z przedstawionych danych wynika także, że w obrębie upraw w tym samym wieku istnieją różnice pomiędzy powierzchniami. Na powierzchniach w Nadl. Stary Sącz więcej sadzonek obumarło na powierzchni Nr 1 niż na powierzchni Nr 2. Najmniej było takich osobników na powierzchni Nr 3 (Nadl. Limanowa), na której z kolei było aż 33,5% sadzonek z obumarłą nadziemną częścią. Na powierzchni Nr 2 był natomiast większy udział sadzonek z zamarłym wierzchołkiem. Jeśli złaczyć udział osobników z dwoma typami symptomów (zamarłe oraz z zamarłą całą nadziemną częścią) to uzyskamy wynik wskazujący, że najlepszy stan zdrowotny przedstawiają sadzonki jesionu na powierzchni Nr 2, rosnące na siedlisku lasu górskiego. Wśród upraw w Nadl. Rokita na powierzchni Nr 4 więcej było sadzonek zamarłych i z zamarłą całą nadziemną częścią niż na powierzchni Nr 5. Zamarcie pędu głównego skutkowało wytwarzaniem jednego lub wielu pędów odroślowych, które na pewien okres pozwoliły wydłużyć życie tym osobnikom.

Grzyby w nekrotycznych tkankach sadzonek w uprawach doświadczalnych identyfikowano na podstawie owocników (analiza 212 pędów głównych) oraz na podstawie izolacji z 690 fragmentów pobranych ze 115 pędów (Tab. 33, 34), według podanej wyżej metodyki dla próbek pobranych z drzewostanów jesionowych. W nekrotycznych tkankach pędów jesionów w uprawach Nr 4 i Nr 5 w Nadl. Rokita stwierdzono 32 gatunki grzybów (Tab. 33). Najczęściej izolowano grzyb *Ch. fraxinea*, którego obecność stwierdzono w 70,0% pędów głównych. Gatunek ten cechował się zbliżoną częstością występowania na sadzonkach w obu analizowanych uprawach. Często izolowano również *Alternaria alternata, Botryosphaeria stevensii, Fusarium avenaceum, F. lateritium* i *Phomopsis* sp. 1. Owocniki na pędach najczęściej wytwarzały: *B. stevensii, Cytospora* sp. 1,

Massaria sp. oraz *Phomopsis* sp. 1. Grzyb *B. stevensii* w zdecydowanej większości wytwarzał stadium anamorficzne, znane jako *Diplodia mutila*. Na zamarłych sadzonkach w uprawie w Leśn. Moracz w ogóle nie stwierdzono jego owocników, zaś poprzez izolacje wykazano jego ponad 5-krotnie mniejszą częstość na tej powierzchni niż w Leśn. Samlino. Z kolei w uprawie w Leśn. Moracz 4-krotnie częściej stwierdzano owocniki *Phomopsis* sp. 1. Znaczne różnice w częstości występowania między uprawami stwierdzano także w przypadku *Coniothyrium fuckelii*, *Cytospora* sp. 1, *F. avenaceum, F. lateritium, Masaria* sp., oraz *Valsa ambiens* (Tab. 33). Owocniki grzybów wykształcały się najczęściej w nasadowej partii strzałek, przy czym było to szczególnie zauważalne w uprawie w Leśn. Moracz. W tej części strzałek owocniki wytwarzał najczęściej grzyb *Phomopsis* sp. 1. Najrzadziej pojawiały się owocniki w szczytowym odcinku strzałek jesionu.

Na podstawie owocników oraz izolacji w chorych i zamarłych tkankach jesionów w uprawach nr 1 do 3 zidentyfikowano grzyby należące do 27 gatunków (Tab. 34). Do najczęstszych gatunków należały: *Phomopsis* spp., *Botryosphaeria stevensii* i *Chalara fraxinea*. Często stwierdzane były również *Cytospora sp., Alternaria alternata, Fusarium lateritium i Massaria* sp. Badania potwierdziły, że możliwość wykazania w tkankach jesionu grzyba *Chalara fraxinea* zależy od okresu jaki upłynie pomiędzy infekcją pędów, a terminem izolacji. Im ten okres jest dłuższy, trudniej izolowana jest *Chalara fraxinea*, zaś częściej izoluje się grzyby wtórnie zasiedlające tkanki, zwłaszcza z rodzaju *Phomopsis* i *Fusarium*. Niekiedy grzyby wtórne uniemożliwiają wyizolowanie właściwego sprawcy nekrozy, grzyba *Chalara fraxinea*, mimo że jest on w tkankach obecny, co potwierdzono poprzez badania genetyczne (Ioos i in. 2009). Stosowane techniki identyfikacji grzybów potwierdziły konieczność izolacji, a nie tylko identyfikacji na podstawie owocników, gdyż to ogranicza liczbę stwierdzanych gatunków. Z przedstawionych danych wynika, że skład gatunkowy najczęstszych gatunków grzybów we wszystkich uprawach doświadczalnych był bardzo zbliżony (Tab. 33, 34). Odmienne warunki lokalne wpływają jednak na nieco zróżnicowany udział ilościowy tych gatunków. Szczególne znaczenie ma lokalnie liczne występowanie *Botryosphaeria stevensii,* gdyż spośród stwierdzonych grzybów, posiada on wykazane właściwości patogeniczne.

Aby uzyskać informacje o gatunkach grzybów występujących w obrębie nekroz młodych jesionów w szkółkach, z nadziemnych części 40 strzałek z objawami zamierania na kwaterach doświadczalnych w szkółce Nadleśnictwa Stary Sącz i Nadleśnictwa Rokita, pobrano 240 fragmentów i wyłożono na pożywkę celem izolacji grzybów. Wśród otrzymanych kolonii wyróżniono 22 gatunki grzybów (Tab. 35). Najliczniej izolowano grzyb *Chalara fraxinea* (65,0%). Licznie stwierdzono również: *Phomopsis scobina* (60,0% pędów) i *Fusarium* sp. (17,5%), a także

Aureobasidium pullulans, Diplodia mutila i *Phomopsis* sp. (Tab. 35). Uzyskane wyniki wskazują, że skład gatunkowy nie różnił się istotnie od mykobiota otrzymanej z nekroz na pędach jesionów rosnących na stałych powierzchniach doświadczalnych.

8. Wybrane elementy genetycznych i biochemicznych uwarunkowań odporności jesionu wyniosłego na zamieranie

8.1. Wstęp i cel badań genetycznych i biochemicznych

Identyfikacja markerów molekularnych związanych z odpornością roślin na patogeny jest kluczowym czynnikiem decydującym o efektywności programów selekcyjnych mających na celu znalezienie odpornych osobników i populacji. Umożliwia ona przeprowadzanie programów selekcji wspomaganej markerami molekularnymi (MAS – marker-assisted selection), zwłaszcza w sytuacjach, gdy odporność na chorobę uwarunkowana jest cechami ilościowymi organizmu i w związku z tym selekcja jest czasochłonna i kosztowna, a jej wyniki zależne od warunków środowiska w jakich funkcjonują organizmy. Jedną z najbardziej czasochłonnych czynności w procesie identyfikacji markerów molekularnych jest konieczność przeprowadzania badań dla dużej liczby osobników rośliny gospodarza i starterów stosowanych w reakcjach PCR (Polymerase Chain Reaction). Problem ten został rozwiązany w obecnie prowadzonych programach selekcyjnych przez opracowanie przez Michelmore i wsp. metody BSA (Bulked Segregant Analysis – Analiza Zbiorczych Prób Segregantów) (1991). Zakłada ona poszukiwanie markerów przy zastosowaniu mieszaniny DNA pochodzącego z dwóch grup osobników z danej populacji różniących się odpornością na chorobę. Analizę pojedynczych osobników tworzących te grupy przeprowadza się tylko wtedy, gdy zostanie stwierdzony polimorfizm DNA między wyróżnionymi grupami. Metoda ta oszczędza czas szczególnie w przypadku cech odporności o nieznanym podłożu genetycznym i w przypadku poszukiwania markerów molekularnych przy zastosowaniu takich metod jak RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), RAMS (Random Amplified Microsatellites) czy AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).

Celem niniejszych badań była molekularna i fizjologiczna analiza odpornych i wrażliwych na infekcję przez *Chalara fraxinea* osobników jesionu. Badania miały za zadanie znalezienie markerów molekularnych związanych z odpornością jesionu na porażenie przez patogena i umożliwiających odróżnienie osobników odpornych od podatnych na infekcję. W zakresie analiz fizjologicznych przeprowadzono badania dotyczące biochemicznej reakcji osobników jesionu na infekcję przez patogena. Określono intensywność i dynamikę tworzenia reaktywnych form tlenu

(ROS – reactive oxygen species), syntezy związków fenolowych i aktywności wybranych enzymów jako reakcji obronnej jesionu na infekcję przez *Chalara fraxinea*.

8.2 Materiał badawczy i metody

Materiał roślinny

Badania przeprowadzono na powierzchniach doświadczalnych założonych w latach 2008 – 2010 w trzech rejonach Polski. Ze względu na konieczność zapewnienia odpowiedniej odległości geograficznej między rejonami powierzchnie zlokalizowano w RDLP Szczecin (Nadleśnictwo Rokita, pow. I – Leśnictwo Golczewo, pow. II – Leśnictwo Błotno), RDLP Radom (Nadleśnictwo Staszów, Leśnictwo Łubnica) i RDLP Kraków (Nadleśnictwo Miechów, Leśnictwo Goszcza i Nadleśnictwo Stary Sącz, wybrane drzewostany). Drzewostany jesionowe będące źródłem materiału badawczego obejmowały kilku do kilkudziesięcioletnie osobniki. Na podstawie stanu zdrowotnego drzew na każdej powierzchni wybrano i trwale oznaczono dwie grupy osobników:

a) osobniki w różnym stopniu porażone przez patogena,

b) osobniki nie wykazujące symptomów choroby.

Każda z grup obejmowała co najmniej kilkanaście osobników. Z każdego osobnika pobrano liście lub w przypadku braku możliwości ich pobrania, fragmenty kory, z których ekstrahowano DNA do badań. Liście i korę utarto w moździerzu po zalaniu ciekłym azotem na proszek, który został umieszczony w probówkach i przechowany w temperaturze -80°C.

Ekstrakcja DNA i ocena jego jakości

W celu doboru odpowiedniej metody ekstrakcji DNA z liści lub w koniecznych przypadkach kory jesionów przeprowadzono testy z zastosowaniem następujących metod: a) Carlsona i in. (1991), b) Khanuja i in. (1999) i c) DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Stężenie i czystość uzyskanego DNA określano spektrofotometrycznie przy długościach fali 260 i 280 nm przy użyciu czytnika mikropłytkowego Biotek Synergy 2 (Biotek, Winooski, VT, USA). Do odczytu absorbancji użyto 96-dołkowych płytek dla oznaczeń w świetle UV firmy Greiner (Greiner Bio-One GmbH, Freckenhausen, Germany) model: UV-star plate, 96 well – flat bottom. Czystość DNA (obecność białek w ekstrakcie) wyliczono jako stosunek absorbancji przy długości fali 260 i 280 nm (A_{260}/A_{280}). Przyjęto, że jeśli A_{260}/A_{280} wynosi około 1.8 to DNA jest wolne od zanieczyszczeń białkowych. Stopień fragmentacji uzyskanego DNA określono przez przeprowadzenie elektroforezy w 1.5% żelu agarozowym (Prona, Madrid, Spain) zawierającym bromek etydyny (0.5 µg/ml) lub barwnik fluorescencyjny Midori Green w stężeniu 0.6 µl/100 ml (Nippon Genetics Europe GmbH, Dueren, Germany) w buforze TBE (0.089 mM TRIS, 0.089 mM kwas borowy,

0.022 mM EDTA, pH= 8,3). Ekstrakty DNA przechowywano w temperaturze -20°C do czasu ich użycia do reakcji PCR.

Optymalizacja warunków reakcji PCR

W celu optymalizacji warunków reakcji PCR przeprowadzono reakcje dla różnych stężeń starterów, genomowego DNA, polimerazy Taq i jonów magnezu. Reakcje zostały wykonane w 10 µl mieszaniny reakcyjnej, w skład której wchodziły: bufor Green Taq, mieszanina dNTP 0.2 mM, jony magnezu 1, 2 lub 4 mM, starter 0.1, 0.2 lub 0.5 µM, polimeraza Dream Taq Green Polymerase 0.1, 0.2 lub 0.5 U (Fermentas, Burlington, Canada), genomowy DNA 40, 60 lub 80 ng.

Reakcje PCR przeprowadzano w termocyklerze Eppendorf Mastercykler EP Gradient S (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) zaprogramowanym w następujący sposób: denaturacja wstępna w temperaturze 95ºC, 5 minut, hybrydyzacja w temperaturze 35ºC, 45 sekund, elongacja w temperaturze 72ºC, 2.5 minuty. Następnie 36 cykli składających się z: denaturacji w temperaturze 95ºC, 60 sekund, hybrydyzacji w temperaturze 35ºC, 45 sekund, elongacji w temperaturze 72ºC, 2.5 minuty. Elongację ostatniego cyklu wydłużono do 8 minut dla całkowitego zakończenia reakcji.

Otrzymane w wyniku reakcji PCR fragmenty DNA rozdzielano elektroforetycznie w 1.5% żelu agarozowym (agaroza Basica LE, Prona, Madrid, Spain) z dodatkiem bromku etydyny (0.5 mg/ml). Sporządzono zdjęcia żeli w świetle UV przy pomocy zestawu do dokumentacji żeli elektroforetycznych Quantum ST4 1000 (Vilber Lurmat, Torcy, France). Warunki reakcji do dalszych analiz dobrano na podstawie wyniku przeprowadzonej elektroforezy.

Wykonanie reakcji PCR z użyciem starterów RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) i RAMS (Random Amplified Microsatellites)

Poszukiwanie markerów molekularnych związanych z odpornością jesionów na porażenie przez *Chalara fraxinea* przeprowadzono z użyciem mieszanin DNA wyekstrahowanego z liści osobników pochodzących z powierzchni założonej w Nadleśnictwie Miechów (RDLP Kraków). Reakcje PCR i analizy BSA (Bulked Segregant Analysis) przeprowadzono dla 12 osobników nie wykazujących objawów choroby i 12 osobników porażonych przez patogena. Dla obu grup jesionów przygotowano po trzy mieszaniny DNA, z których każda zawierała kwas nukleinowy pochodzący z czterech osobników. Stężenie DNA w mieszaninach wynosiło 30 ng/µl (po około 8 ng DNA z każdego badanego osobnika).

Reakcje PCR wykonano w 10 µl mieszaniny reakcyjnej o następującym składzie: bufor Green Taq, dNTP 0.2 mM, jony magnezu 2 mM, starter 0.5 µM, polimeraza: Dream Taq Green Polymerase 0.25 U (Fermentas, Burlington, Canada), genomowy DNA 60 ng. Do reakcji zastosowano 9- i 10-nukleotydowe startery, których sekwencje uzyskano z bazy starterów firmy Eurofins MWG Operon

i UBC Biotechnology Laboratory. Testowano następujące zestawy starterów RAPD firmy Eurofins MWG Operon: A01-A20, B01-B20, C01-C20, D01-D20, E01-E20, F01-F20, G01-G20, H01-H20, I01-I20, J01-J20, K01-K20, L01-L20, M01-M20, N01-N20, O01-O20, P01-P20, Q01-Q20, R01-R20, S01-S20, T01-T20, U01-U20, V01-V20, W01-W20, X01-X20, Y01-Y20, Z01-Z20, AA01-AA20, AB01-AB20, AC01-AC20, AD01-AD20, AE01-AE20, AF01-AF20, AG01-AG20, AH01-AH20, AI01-AI20 oraz startery RAMS firmy UBC Biotechnology Laboratory: UBC876-UBC892, UBC895, UBC899, UBC900. Razem sprawdzono 720 starterów. Reakcje PCR przeprowadzano w termocyklerze Eppendorf Mastercykler EP Gradient S (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) zaprogramowanym w następujący sposób: denaturacja wstępna w temperaturze 95ºC, 5 minut, hybrydyzacja w temperaturze 35ºC, 45 sekund, elongacja w temperaturze 72ºC, 2.5 minuty. Następnie 36 cykli składających się z: denaturacji w temperaturze 95ºC, 60 sekund, hybrydyzacji w temperaturze 35ºC, 45 sekund, elongacji w temperaturze 72ºC, 2.5 minuty. Elongację ostatniego cyklu wydłużono do 8 minut dla całkowitego zakończenia reakcji.
Dla każdego startera przeprowadzono 6 reakcji PCR z wykorzystaniem przygotowanych wcześniej mieszanin DNA (po 3 dla osobników porażonych przez patogena i osobników nie wykazujących objawów choroby) oraz reakcję kontrolną (bez DNA). Każdą reakcję PCR przeprowadzono 2 razy dla stwierdzenia powtarzalności wyników amplifikacji. W sumie dla wszystkich starterów przeprowadzono prawie 11 000 reakcji PCR.

Elektroforeza produktów reakcji i poszukiwanie markerów powiązanych z odpornością na patogena
Otrzymane produkty amplifikacji DNA rozdzielano elektroforetycznie w 1.5% żelu agarozowym z wykorzystaniem agarozy Basica LE (Prona, Madrid. Spain) z dodatkiem barwnika Midori Green (Nippon Genetics Europe GmbH, Dueren, Germany). Elektroforezę prowadzono w buforze TBE (0.089 mM TRIS, 0.089 mM kwas borowy, 0.022 mM EDTA, pH= 8,3). Jako markera długości produktów amplifikacji użyto GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas, Burlington, Canada). Sporządzono zdjęcia żeli w świetle UV przy pomocy zestawu do dokumentacji żeli elektroforetycznych Quantum ST4 1000 (Vilber Lurmat, Torcy, France). Długości produktów amplifikacji odczytano za pomocą programu BIO-PROFIL Bio-1D++ ver. 11.11 (Vilber Lourmat, Torcy, France). Poszukiwano starterów dających monomorficzne prążki dla wszystkich trzech mieszanin DNA jednej grupy osobników i nie dających prążków dla mieszanin drugiej grupy.

Przeprowadzenie wstępnego testowania działania markerów na wybranych populacjach
Dla wybranych wstępnie markerów (powstałych z użyciem 58 starterów) przeprowadzono analizę ich występowania na pojedynczych osobnikach pochodzących z czterech populacji z oddalonych geograficznie Nadleśnictw: Nadleśnictwa Rokita, pow. II (RDLP Szczecin), Nadleśnictwa Staszów

(RDLP Radom), Nadleśnictwa Miechów (RDLP Kraków) i Nadleśnictwa Stary Sącz (RDLP Kraków). Dla każdej populacji zastosowano 12 osobników wykazujących objawy zamierania i 12 osobników odpornych na chorobę (razem 96 osobników). Reakcje PCR przeprowadzano zgodnie z następującym programem: denaturacja wstępna w temperaturze 95ºC, 5 minut, hybrydyzacja w temperaturze 35ºC, 45 sekund, elongacja w temperaturze 72ºC, 2.5 minuty. Następnie 36 cykli składających się z: denaturacji w temperaturze 95ºC, 60 sekund, hybrydyzacji w temperaturze 35ºC, 45 sekund, elongacji w temperaturze 72ºC, 2.5 minuty. Elongację ostatniego cyklu wydłużono do 8 minut dla całkowitego zakończenia reakcji.

Testowania działania markerów na wyselekcjonowanych przez sztuczną inokulację szczepami grzyba patogenicznego Chalara fraxinea osobnikach jesionu

Przygotowanie materiału roślinnego

W roku 2010 na powierzchni doświadczalnej założonej w Wielmoży (Nadleśnictwo Miechów) przeprowadzono selekcję osobników jesionu pod względem tolerancji na infekcję grzybem *Chalara fraxinea*. Jej celem było wyodrębnienie grup roślin o różnej odporności na infekcję przez patogena. Powierzchnia doświadczalna obejmowała 155 trzy-cztero letnich osobników jesionu pochodzących z Nadleśnictwa Staszów (RDLP Radom) oraz 149 dwuletnich osobników z Nadleśnictwa Rokita, pow. I (RDLP Szczecin). W maju 2010 roku wyhodowano kultury następujących szczepów *Chalara fraxinea*: 19040 (pochodzący z Nadleśnictwa Staszów), Js3230 (Nadleśnictwo Stary Sącz) i Js 3210 (Nadleśnictwo Rokita). Kawałki drewna jesionu o wymiarach około 2 x 2 x 10 mm sterylizowano przez 20 minut w 120°C, a następnie umieszczano w szalkach Petriego na powierzchni kultury grzyba. Po przerośnięciu kawałków drewna przez grzyba stosowano je do szczepienia. Szczepienie roślin jesionu wykonywano 29 czerwca w następujący sposób: rośliny jesionu (po 24 osobniki dla każdego szczepu *Chalara fraxinea*) były nacinane w odległości około 10-15 cm od wierzchołka wzrostu za pomocą sterylnego skalpela. Długość nacięcia wynosiła 10-15 mm, a głębokość około 2-3 mm. Do nacięcia wkładano przerośnięte grzybem kawałki drewna, a następnie zranienie owijano paskiem parafilmu. Szczepienie wykonano na roślinach pochodzących z obu populacji (Nadleśnictwa Staszów i Nadleśnictwa Rokita). Razem szczepieniu poddano po 72 rośliny. Dla każdej populacji wykonano również szczepienia kontrolne dla 10 roślin przy użyciu sterylnych kawałków drewna nie wykładanych na powierzchnię grzybni (nieprzerośniętych grzybem). Selekcję roślin wykonano w oparciu o dwa wskaźniki: a) objawy więdnięcia liści i zamierania wierzchołkowej części (powyżej miejsca szczepienia) roślin, b) długość nekroz powodowanych przez patogena. Obserwacje więdnięcia liści i zamierania wierzchołkowej części roślin przeprowadzano w ciągu 1 miesiąca od 16.07.2010 r. co 10 dni. W każdym z terminów

obserwacji poszczególnym osobnikom przypisywano jedną z następujących ocen: 0 – roślina zdrowa, nie wykazująca objawów więdnięcia, 1 – roślina chora, wykazująca objawy więdnięcia liści i/lub zamierania wierzchołkowej części pędu. Końcowym wskaźnikiem tolerancji poszczególnych roślin na infekcję patogenem była suma ocen (0 lub 1) uzyskanych w ciągu 4 obserwacji. Wskaźnik tolerancji przyjmował więc wartości w zakresie od 0 (rośliny tolerujące infekcję) do 4 (rośliny wykazujące brak tolerancji na patogena). W każdym z terminów obserwacji, dla poszczególnych szczepów wyliczono frekwencję osobników chorych i ich procentowy udział. Długość nekroz zmierzono 7 października. Dla wszystkich osobników uwzględniono część nekroz powstałych poniżej miejsca szczepienia, natomiast w przypadku osobników, u których wierzchołkowa część pędu była żywa zmierzono również część nekrozy powyżej miejsca szczepienia.

W roku 2011 na powierzchni doświadczalnej w Wielmoży kontynuowano obserwacje mające na celu wybór osobników o zróżnicowanej tolerancji na infekcję *Chalara fraxinea*. Przeprowadzono dwukrotną obserwację stanu zdrowotnego roślin jesionu: 30 maja i 9 lipca. Każdemu z osobników przypisano jedną z następujących ocen przeżywalności:

0 – brak objawów (osobnik zdrowy)
1 – zamarły wierzchołek, obecne odrośla
2 – osobnik martwy

Dla każdego z terminów obserwacji oceniono frekwencję osobników, którym przypisano poszczególne oceny.

Analizy molekularne wykonano na 60 losowo wybranych osobnikach jesionu z Nadleśnictwa Rokita uprzednio poddanych sztucznej inokulacji za pomocą szczepów *Chalara fraxinea*. Losowanie wykonano w taki sposób, aby dla populacji została zachowana proporcja osobników charakteryzujących się określonymi ocenami podatności na zamieranie. Ekstrakcję DNA z proszku liści przeprowadzono zgodnie ze zmodyfikowaną w ramach obecnego projektu metodą Khanuja i in. Dla otrzymania markera R_AC03, specyficznego dla odpornych osobników pochodzących z populacji z Nadleśnictwa Rokita przeprowadzono reakcję PCR przy użyciem startera AC03. Termocykler został zaprogramowany w następujący sposób: denaturacja wstępna w temperaturze 95ºC, 5 minut, hybrydyzacja w temperaturze 36ºC (temperatura została podwyższona o 1°C dla zwiększenia specyficzności reakcji), 45 sekund, elongacja w temperaturze 72ºC, 2.5 minuty. Następnie 36 cykli składających się z: denaturacji w temperaturze 95ºC, 60 sekund, hybrydyzacji w temperaturze 36ºC, 45 sekund, elongacji w temperaturze 72ºC, 2.5 minuty. Elongację ostatniego cyklu wydłużono do 8 minut dla całkowitego zakończenia reakcji. Rozdział elektroforetyczny

produktów reakcji przeprowadzono w 1.5% żelu agarozowym z dodatkiem barwnika fluorescencyjnego Midori Green w buforze TBE. Marker R_AC03 występuje u osobników zdrowych, natomiast nie jest on obecny u osobników wykazujących podatność na infekcję. Osobniki wykazujące obecność markera traktowano więc jako odporne na infekcję przez *Chalara fraxinea*.

Dla populacji z Nadleśnictwa Staszów nie uzyskano markera molekularnego pozwalającego na odróżnienie osobników jesionu z odpowiednio wysoką wiarygodnością.

Opracowanie markerów SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions)

Przeprowadzono reakcje PCR z użyciem starterów RAPD dających monomorficzne markery dla jednej grupy osobników (porażonych lub nie wykazujących symptomów choroby). Reakcję wykonano przy zastosowaniu termostabilnej polimerazy Pwo (A&A Biotechnology, Gdańsk). Dla rozdzielenia produktów reakcji PCR wykonano elektroforezę w żelu agarozowym (agaroza Basica LE, Prona, Madrid. Spain). Odpowiednie fragmenty DNA (markery) izolowano z żelu i oczyszczano za pomocą zestawu Gel-Out (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska). Do klonowania DNA użyto wektora pJET1 (3100 par zasad; Fermentas, Burlington, Canada). Reakcję ligacji wykonano w objętości 20 µl. W skład mieszaniny ligacyjnej wchodziły: 1µl DNA wektora pJET1, 9 µl DNA odpowiedniego produktu PCR, 1 µl ligazy DNA T4, 9 µl wody dejonizowanej. Ligację prowadzono przez 45 minut w temperaturze pokojowej. Komórki kompetentne *Escherichia coli* uzyskano z użyciem zestawu do przygotowania i transformacji *Escherichia coli* - *E. coli* Transformer (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska).

Po transformacji próbki przeniesiono na płytki z podłożem stałym LA (trypton 10 g/l, ekstrakt drożdżowy 5 g/l, NaCl 10g/l, agar 20 g/l) i ampicyliną (50 µl/ml) i inkubowano 16 godzin w temperaturze 37°C. Na płytkach wyrosło od 15 do 25 koloni. Z każdej płytki wybrano 8 kolonii potencjalnych klonów i sprawdzono w nich obecność klonowanych markerów za pomocą reakcji PCR przy użyciu starterów flankujących miejsce klonowania:

pJETF – GCCTGAACACCATATCCATCC

pJETR – GCAGCTGAGAATATTGTAGGAGAT.

Reakcję PCR przeprowadzono zgodnie z następującym programem: denaturacja wstępna w temperaturze 95ºC, 2 minuty, następnie 30 cykli składających się z: denaturacji w temperaturze 95ºC, 30 sekund, hybrydyzacji w temperaturze 55ºC, 30 sekund, elongacji w temperaturze 72ºC, 1 minuta. Elongację ostatniego cyklu wydłużono do 5 minut.

Następnie wykonano izolację plazmidów rekombinowanych. Przeniesiono kolonie transformantów *E. coli* TOP10F' z potwierdzoną obecnością klonowanych odcinków DNA do 10 ml podłoża płynnego LB z ampicyliną (50 µl/ml) i inkubowano przez 17 godzin w temperaturze 37°C z

wytrząsaniem. Z otrzymanych hodowli wyizolowano potencjalne plazmidy rekombinowane przy użyciu zestawu do izolacji plazmidowego DNA - Plasmid Mini AX (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska). W wyniku izolacji otrzymano DNA plazmidów o stężeniu 100-150 µg/ml w 50 µl buforu TE. W plazmidach ponownie potwierdzono obecność klonowanych genów za pomocą reakcji PCR z użyciem starterów pJETF i pJETR. Sekwencjonowanie plazmidów zostało wykonane przez firmę Macrogen Europe, Amsterdam, Holandia.
Edycję sekwencji i opracowanie specyficznych dla poszczególnych markerów starterów wykonano z użyciem programu komputerowego Geneious 5.6.6 (Biomatters Ltd, New Zeland).

Badanie rozkładu częstotliwości występowania markerów w wybranych populacjach jesionu
Badania wykonano dla populacji, dla których uzyskano markery molekularne pozwalające na odróżnienie osobników podatnych na infekcję i osobników odpornych. Populacje te pochodziły z Nadleśnictw: Rokita (RDLP Szczecin), Miechów (RDLP Kraków) i Stary Sącz (RDLP Kraków). Zebrano materiał do uzyskania DNA z 60 losowo wybranych osobników z populacji o znanym stanie zdrowotnym (po 30 wstępnie zakwalifikowanych jako wrażliwe lub odporne na zamieranie). Do uzyskania markera odróżniającego osobniki wrażliwe od podatnych na infekcję zastosowano następujące markery:
dla populacji z Nadleśnictwa Rokita: R_A02
dla populacji z Nadleśnictwa Miechów: M_L08
dla populacji z Nadleśnictwa Stary Sącz: SS_I13
Dla otrzymania markerów zastosowano startery SCAR o sekwencjach podanych w rozdziale „Wyniki". Ze względu na cechy wymienionych markerów osobniki z Nadleśnictwa Rokita i Nadleśnictwa Miechów wykazujące obecność markerów traktowano jako wrażliwe, natomiast osobniki z Nadleśnictwa Stary Sącz jako odporne.

Wybrane elementy biochemicznego podłoża odporności jesionu na porażenie przez Chalara fraxinea
W odpowiedzi na infekcję roślin przez grzyby istotną rolę odgrywają tzw. reaktywne formy tlenu – reactive oxygen species (ROS). Należą do nich przede wszystkim nadtlenek wodoru (H_2O_2), anionorodnik ponadtlenkowy ($O^{\bullet}_2^-$) i rodnik hydroksylowy ($OH^{\bullet}$). Produkcja reaktywnych form tlenu jest pierwszym etapem odpowiedzi rośliny na atak przez patogeny pojawiającym się w ciągu kilku minut po infekcji. Jest on reakcją biologicznie niespecyficzną, po której w komórkach zaatakowanych przez grzyba występuje tzw. wybuch tlenowy (oxidative burst). Rezultatem wybuchu tlenowego jest nagłe zwiększenie w porażonej tkance stężenia reaktywnych form tlenu przekraczające zdolności wyłapywania tych cząstek przez system antyoksydacyjny komórek.

Skutkiem tego jest peroksydacja lipidów błon komórkowych, uszkadzanie makrocząsteczek takich jak barwniki asymilacyjne, białka, kwasy nukleinowe i lipidy, a także inaktywacja systemu enzymatycznego komórki prowadząca do zamierania porażonej tkanki. W warunkach normalnego wzrostu rośliny dysponują rozbudowanymi mechanizmami usuwania nadmiaru reaktywnych form tlenu przede wszystkim nadtlenku wodoru i anionorodnika ponadtlenkowego. Głównymi enzymami usuwającymi H_2O_2 i $O^{\bullet}_2{}^-$ i chroniącymi komórki przed uszkodzeniem i zamieraniem jest dysmutaza ponadtlenkowa i katalaza.

Poza reaktywnymi formami tlenu istotną rolę w obronie roślin przed patogenami pełnią związki fenolowe. Są one powszechnie występującymi w roślinach związkami metabolizmu wtórnego. Pełnią rolę związków antyoksydacyjnych i chronią komórki przed oksydacyjnym działaniem reaktywnych form tlenu. Z drugiej strony mogą zaburzać prawidłowe funkcjonowanie błon komórkowych i uczestniczyć w peroksydacji lipidów.

Badania dotyczące biochemicznego podłoża odporności jesionu na infekcję przez *Chalara fraxinea* przeprowadzono w dwóch etapach: wstępne badania miały na celu określenie stężenia i dynamiki powstawania reaktywnych form tlenu tworzonych przez osobniki jesionu w odpowiedzi na infekcję przez *Chalara fraxinea*. Celem właściwych badań było określenie reakcji roślin o różnej odporności na infekcję w zakresie intensywności i czasu tworzenia reaktywnych form tlenu, związków fenolowych oraz aktywności katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej.

Badania wstępne

Badania przeprowadzono na dwuletnich roślinach jesionu pochodzących ze szkółki w Nadleśnictwie Staszów (RDLP Radom). Jednoroczne siewki jesionu zostały posadzone do doniczek o pojemności 5 l. Jako podłoże zastosowano substrat torfowy STM4, pH 5.5-6.5. W okresie wegetacyjnym prowadzono nawadnianie wraz z nawożeniem aplikując nawóz Florovit w stężeniu 0,1%. Po zakończeniu wzrostu i częściowym zdrewnieniu pędów wykonano szczepienie grzybem *Chalara fraxinea*. W tym celu przygotowano sterylne kawałki drewna jesionu o wymiarach około 2 x 2 x 10 mm, które wyłożono na powierzchni kultury grzyba. Po przerośnięciu kawałków drewna przez grzyba zastosowano je do szczepienia roślin. Szczepienie wykonano w sposób opisany wyżej. Wykonano również szczepienie kontrolne za pomocą sterylnych kawałków drewna jesionu nieprzerośniętych grzybem.

W celu wykonania analiz biochemicznych ze szczepionych roślin pobierano odcinki pędu w obrębie których znajdowało się miejsce szczepienia. Pozyskane odcinki pędów natychmiast zamrażano w ciekłym azocie w celu zatrzymania reakcji biochemicznych. Pędy odcinano po 1, 3, 8, 16 i 33 dniach od daty szczepienia. W każdym terminie pobierano odcinki pędu z 10 roślin szczepionych kawałkami drewna przerośniętymi grzybem oraz 5 odcinków pędu z roślin kontrolnych

(szczepionych kawałkami drewna nieprzerośniętych grzybem). Wykonano również pomiar długości nekroz w terminach, gdy były one widoczne tj. po 16 i 33 dniach od momentu szczepienia. Długość nekroz stosowano jako miarę podatności osobników jesionu na infekcję grzybem.

Odcinki pędów były ucierane w moździerzu w ciekłym azocie na proszek, który następnie przechowywano w -80°C. Oznaczono zmiany koncentracji anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\bullet-}$) i nadtlenku wodoru (H_2O_2) w szczepionych pędach jesionu.

Oznaczanie stężenia anionorodnika ponadtlenkowego

Anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\bullet-}$) oznaczono w homogenacie uzyskanym przez wytrząsanie 50 mg proszku z pędów w 1 ml roztworu zawierającego 50 mM bufor fosforanowy (pH 7.8), 0.8% Triton X-100 i 1% poliwinylopirolidonu. Homogenat wirowano przez 15 minut przy 13000 obrotach/minutę, w temperaturze 4°C. Stężenie anionorodnika ponadtlenkowego oznaczano przez przeprowadzenie reakcji redukcji błękitu nitrotetrazolinowego (NBT) do farmazonu w roztworze zawierającym supernatant, 40 μM NADPH i 100 μM NBT (Green, Hill 1984). Intensywność reakcji określano monitorując wzrost absorbancji roztworu przy 490 nm w ciągu 10 minut. Stężenie anionorodnika ponadtlenkowego wyliczono używając współczynnika ekstynkcji równego 100 mM^{-1} cm^{-1}.

Oznaczanie stężenia nadtlenku wodoru

Nadtlenek wodoru (H_2O_2) oznaczano przez przeprowadzenie reakcji utleniania guaiakolu do tetraguaiakolu. 50 mg proszku z pędów wytrząsano przez 90 minut w mieszaninie reakcyjnej zawierającej 50 mM bufor fosforanowy (pH 7.0), 0.05% guaiakolu i 2 U/ml peroksydazy (Orendi et al. 2001). Homogenat wirowano przez 15 minut przy 13000 obrotach/minutę, w temperaturze 4°C. Zmierzono absorbancję przy 470 nm. Stężenie nadtlenku wodoru obliczono przy założeniu, że 4 mole nadtlenku wodoru są potrzebne, aby powstał 1 mol tetraguaiakolu, dla którego współczynnik ekstynkcji wynosi 26.6 mM^{-1} cm^{-1}.

Biochemiczna odpowiedź osobników jesionu na infekcję przez Chalara fraxinea – badania właściwe

Badania prowadzono na trzyletnich roślinach jesionu pochodzących z Nadleśnictwa Staszów (RDLP Radom). W doświadczeniach zastosowano rośliny posadzone w 2009 roku do doniczek do substratu STM4, pH 5.5-6.5. We wrześniu 2010 roku przeprowadzono ponowne szczepienie grzybem celem potwierdzenia stopnia tolerancji badanych osobników jesionu na infekcję przez *Chalara fraxinea*. W marcu 2011 roku w celu potwierdzenia występowania grzyba w powstałych nekrozach przeprowadzono reizolację grzyba ze zmienionych chorobowo tkanek. Na początku

kwietnia 2011 roku wykonano pomiar długości nekroz, którą zastosowano jako miarę podatności osobników na infekcję przez patogena. Na podstawie długości nekroz wyróżniono trzy klasy osobników o różnym stopniu tolerancji na infekcję grzybem. Grupy osobników tworzących wymienione klasy wykorzystano do dalszych badań biochemicznych.

30 lipca 2011 roku wykonano szczepienie grzybem wyróżnionych klas osobników. Szczepienie przeprowadzono zgodnie z przedstawioną wcześniej metodyką. Z zainfekowanych roślin pobierano odcinki pędów obejmujące miejsce szczepienia. Ze względu na bardzo szybkie zmiany zawartości cząsteczek anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\bullet-}$) i nadtlenku wodoru (H_2O_2) w zainfekowanych tkankach pozyskane odcinki pędów natychmiast zamrażano w ciekłym azocie w celu zatrzymania reakcji biochemicznych. Odcinki pędów były ucierane w moździerzu w ciekłym azocie na proszek, który przechowywano w -80°C do czasu wykonania analiz. Pędy odcinano dokładnie po 6, 24, 48 i 72 godzinach po wykonanym szczepieniu.

Zawartość anionorodnika ponadtlenkowego i nadtlenku wodoru oznaczono zgodnie z metodyką przedstawioną wcześniej.

Oznaczenie stężenia fenoli ogólnych

Fenole ogólne w pędach jesionu oznaczono zgodnie z metodą Folin-Ciocalteau zmodyfikowaną przez Ainsworth i Gillespie (2007). Około 20-30 mg proszku z pędów jesionu wytrząsano przez 30 minut na lodzie z 2 ml 95% metanolu. Następnie próbki inkubowano w temperaturze pokojowej w ciemności. Homogenat wirowano przez 10 minut z szybkością 13000 obrotów/minutę. Oznaczenie wykonano w następujący sposób: 200 µl ekstraktu zmieszano z odczynnikiem Folin-Ciocalteu. Po około 1-2 minutach dodano roztwór węglanu sodu dla zalkalizowania mieszaniny. Próbki inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Odczytano absorbancję dla 765 nm (A_{765}) względem próby ślepej (95% metanol). Dla określenia stężenia fenoli w ekstrakcie wyznaczono krzywą kalibracyjną dla następujących stężeń kwasu chlorogenowego w 95% metanolu: 50 µM, 100 µM, 200 µM, 400 µM, 800 µM, 1.6 mM, 3,2 mM. Obliczono zawartość fenoli ogólnych jako ekwiwalent kwasu chlorogenowego przy użyciu równania regresji między stężeniem kwasu chlorogenowego a A_{765}.

Oznaczenie zawartości flawonoidów

Zawartość flawonoidów (fenoli absorbujących promieniowanie UV) oznaczono zgodnie z metodyką opracowaną przez Zhishen, Mengcheng i Jianming (1999). Około 20-30 mg proszku z pędów jesionu wytrząsano przez 60 minut na lodzie z 2 ml 80% etanolu. Homogenat wirowano

przez 10 minut z szybkością 13 000 g. Oznaczenie wykonano w następujący sposób: Do 7 ml probówek odmierzono 250 µl ekstraktu, dodano wody dejonizowanej do objętości 2,5 ml, a następnie 5% azotynu sodu. Po 5 minutach dodano 10% chlorek glinu, a po następnych 6 minutach 1 M wodorotlenku sodu. Odczytano absorbancję dla długości fali 510 nm względem próby ślepej (80% etanol). Stężenie flawonoidów wyznaczono z krzywej kalibracyjnej dla następujących stężeń kwercetyny: 12.5, 25, 50, 100, 200 µg/ml.

Ekstrakcja enzymów dla określenia aktywności katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej:

Ze względu na duże stężenie fenoli w pędach jesionu przeprowadzono optymalizację składu buforu do ekstrakcji białek enzymatycznych. Skład zastosowanego buforu był następujący: 100 mM bufor fosforanowy, pH 7.8, Triton X-100 – 0,5%, PVPP – 5%, EDTA – 2 mM, glicerol - 8%, DTT – 1 mM. Do ekstrakcji stosowano 50 mg proszku z pędów jesionu, które zalewano buforem ekstrakcyjnym. Homogenat wirowano w 4°C przez 15 minut przy 15000 obrotach/minutę. Stężenie białek enzymatycznych określono metodą Bradforda używając jako standardu białka BSA (Bovine Serum Albumin). Homogenat użyto do określenia aktywności enzymów.

Oznaczenie aktywności katalazy

Aktywność katalazy określono przez pomiar rozkładu nadtlenku wodoru przy długości fali 240 nm. Mieszanina reakcyjna zawierała: 25 mM bufor fosforanowy, pH 7.0, 10 mM H_2O_2 i 20 µl ekstraktu białek. Końcowa objętość mieszaniny wynosiła 200 µl. Reakcję rozkładu nadtlenku wodoru przez enzym przeprowadzono w temperaturze 30°C. Aktywność enzymu wyrażono w jednostkach aktywności na mg świeżej masy przy czym za 1 U przyjęto ilość enzymu powodującego zmianę absorbancji o 0.1 jednostki.

Oznaczenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej

Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej oznaczono spektrofotometrycznie na podstawie redukcji cytochromu c przez anionorodnik ponadtlenkowy generowany w reakcji ksantyny z oksydazą ksantynową (McCord, Frederovich 1969). Wynik przeliczano na ilość umownych jednostek

aktywności enzymatycznej na mg świeżej masy tkanki pędu jesionu, przy czym za jednostkę przyjęto taką ilość dysmutazy ponadtlenkowej, która prowadzi do inhibicji procesu redukcji cytochromu c o 50%.

Wszystkie analizy wykonano w trzech powtórzeniach z użyciem czytnika mikropłytkowego BioTek Synergy 2 (BioTek Instruments Inc.).

8.3 Wyniki

Ekstrakcja DNA i ocena jego jakości

Najlepszą metodą ekstrakcji DNA z liści jesionu okazała się metoda opracowana przez Khanuja i in. (1999) zmodyfikowana w ramach obecnego projektu. W wyniku przeprowadzonych prób zmieniono następujące elementy metody:

1. Zmieniono skład buforu ekstrakcyjnego przez zwiększenie zawartości β-merkaptoetanolu i poliwinylpirolidonu (PVP). Skład buforu który zastosowano w analizach przedstawia poniższa tabela.

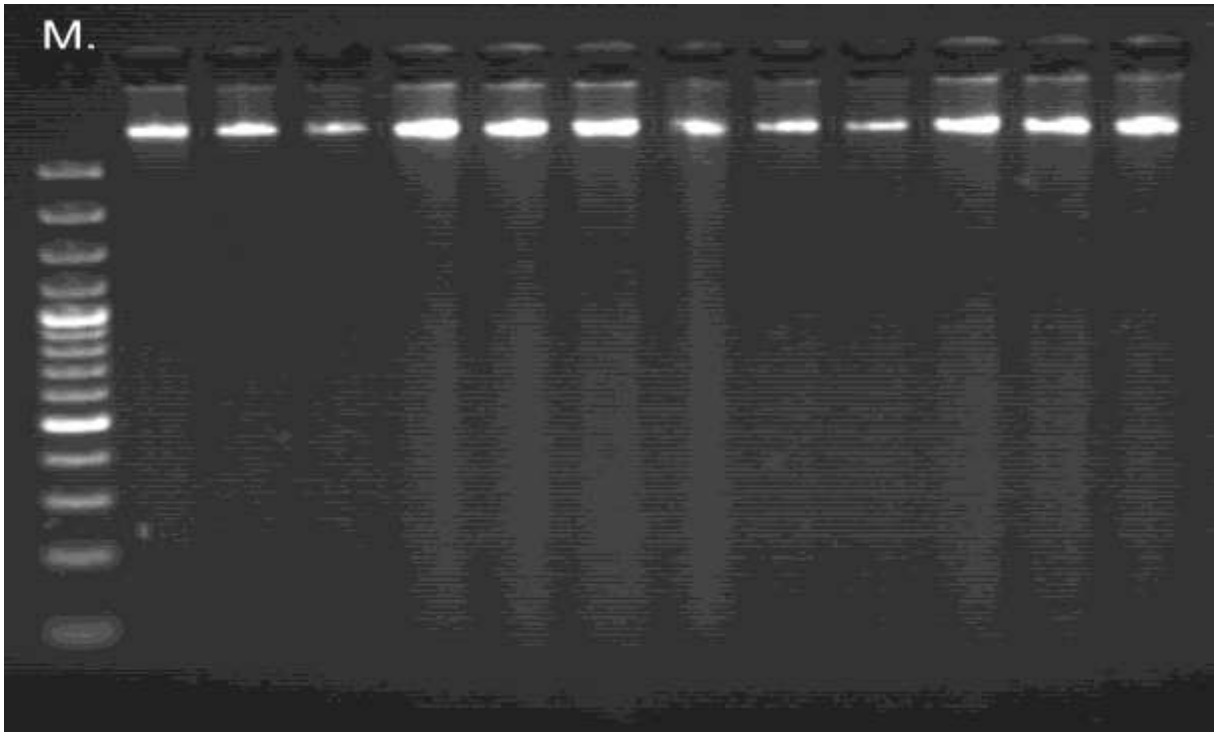
Skład buforu wyjściowego (wg. Khanuja i in. 1999) i zmodyfikowanego do ekstrakcji DNA z liści jesionu wyniosłego (*Fraxinus excelsior* L.)

Składnik buforu ekstrakcyjnego	Bufor wg. Khanuja i in. (1999)	Bufor zmodyfikowany
TrisHCl pH 8,0	100 mM	100 mM
EDTA	25 mM	25 mM
NaCl	1,5 M	1,5 M
CTAB	2,5%	2,5%
β-merkaptoetanol	0.2%	1%
PVP 15000	1%	5%

2. Zwiększono temperaturę inkubacji próbek z 60 do 65°C.

3. Zwiększono szybkość wirowania próbek po inkubacji z 8 000 do 14 000 obr./min.

Dodatkowe modyfikacje metody ekstrakcji DNA przeprowadzono dla zwiększenia wydajności ekstrakcji z kory jesionu. Polegały one na zwiększeniu masy tkanki i czasu jej inkubacji w 65°C z 1 godziny do 2 godzin. Zwiększono również stosunek objętości buforu do masy tkanki. Stwierdzono, że ekstrakcja DNA przy użyciu zmodyfikowanej metody Khanuja i in. zapewniała wystarczającą dla dalszych analiz czystość i stężenie DNA. Średnio dla badanych osobników jesionu pochodzących z analizowanych populacji uzyskano od 0.48 do 1 µg/µl DNA przy zastosowaniu do ekstrakcji 100 mg tkanki. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że chore osobniki zawierały mniej DNA niż osobniki nie wykazujące objawów choroby (odpowiednio 0.43 i 0.58 µg/µl). Czystość DNA oznaczona jako stosunek absorbancji przy 260 i 280 nm była podobna dla obu grup osobników i wynosiła średnio od 1.5 do 1.9. Stopień fragmentacji uzyskanego DNA był bardzo mały, co świadczyło o jego wysokiej jakości i przydatności do reakcji PCR. Przykładowy elektroforogram przedstawia rycinie 1.



Ryc. 1. Obraz elektroforezy przedstawiający stopień fragmentacji DNA wyekstrahowanego z liści jesionu za pomocą zmodyfikowanej metody Khanuja i in., M – marker – GeneRuler 100-bp Ladder Plus.

Pozostałe metody ekstrakcji były mniej przydatne. Ekstrakcja DNA przeprowadzona zgodnie z metodą Carlsona i in. dawała wystarczające stężenie DNA, ale wydajność reakcji PCR była znacznie gorsza w porównaniu z metodą Khanuja. Było to spowodowane obecnością dużej ilości związków fenolowych w liściach jesionu hamujących działanie polimerazy DNA. W przypadku ekstrakcji DNA przeprowadzonej za pomocą DNeasy Plant Mini Kit otrzymywano DNA o wysokiej czystości, ale stężenie DNA było bardzo niskie, niewystarczające do przeprowadzenia odpowiedniej liczby reakcji PCR. Stosowanie DNeasy Plant Mini Kit powodowałoby więc konieczność wielokrotnego przeprowadzania ekstrakcji dla zapewnienia odpowiedniej ilości DNA.

Optymalizacja warunków reakcji PCR

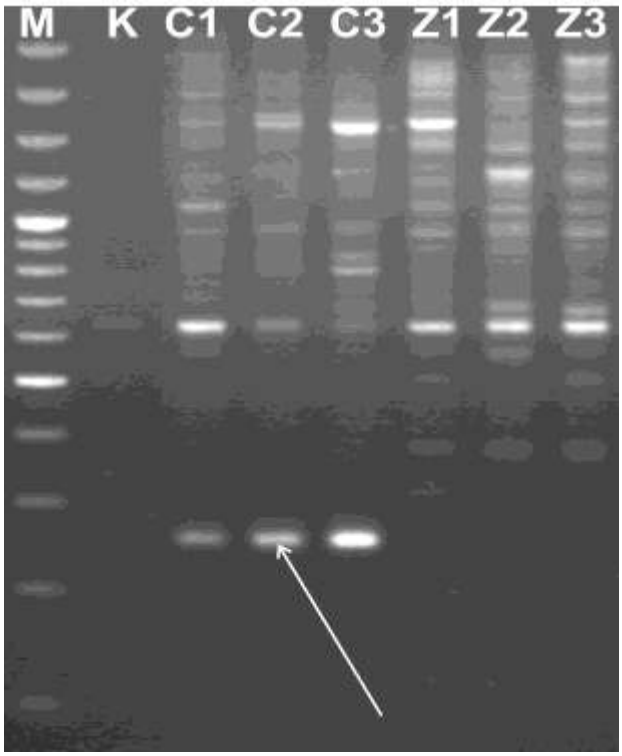
W zależności od stężenia jonów magnezu, startera, polimerazy DNA i genomowego DNA uzyskano różną liczbę produktów reakcji PCR. Na podstawie uzyskanych wyników zdecydowano o stosowaniu następujących warunków reakcji w dalszych analizach:

1. Stężenie jonów magnezu – 2 mM
2. Stężenie startera – 0.5 µM
3. Stężenie polimerazy Taq – 0.25 U/10 µl mieszaniny reakcyjnej
4. Stężenie genomowego DNA – 60 ng/10 µl mieszaniny reakcyjnej

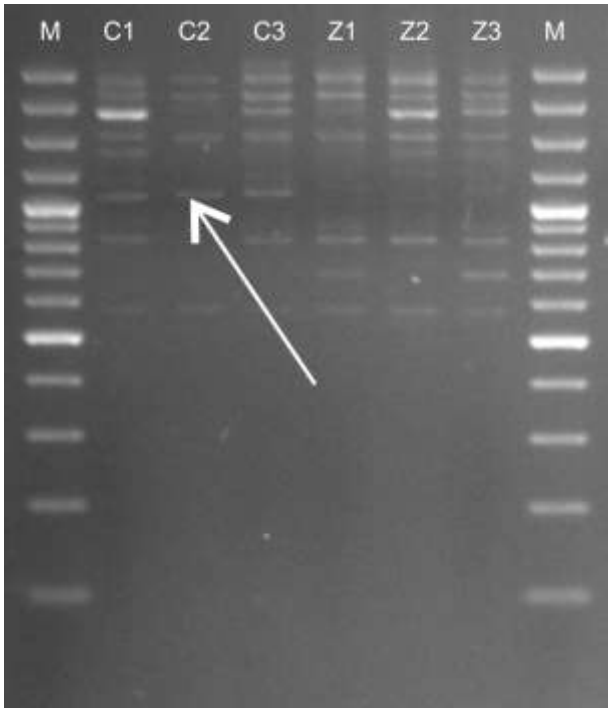
Wykonanie reakcji PCR z użyciem starterów RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) i RAMS (Random Amplified Microsatellites)

Z testowanych 720 starterów powtarzalny wynik reakcji PCR dawało 536 starterów (67%), słaby elektroforogram uniemożliwiający przeprowadzenie analizy dawało 54 startery (prawie 7%), natomiast 205 starterów nie dawało produktów reakcji PCR. Dla starterów dających czytelne wyniki (536 starterów) otrzymano razem prawie 7600 fragmentów DNA (produktów reakcji PCR). Przeprowadzono analizę obecności markerów dla reakcji z zastosowaniem mieszanin DNA pochodzącego z osobników zdrowych i osobników z objawami choroby. Do dalszych analiz wybrano startery, które dały monomorficzne prążki dla wszystkich trzech mieszanin DNA dla jednej grupy osobników (osobników porażonych przez patogena lub osobników nie wykazujących objawów choroby) i jednocześnie nie dały prążków dla drugiej. Wybrano 58 starterów (8%) do testowania obecności markerów w pojedynczych osobnikach z wybranych populacji jesionu.

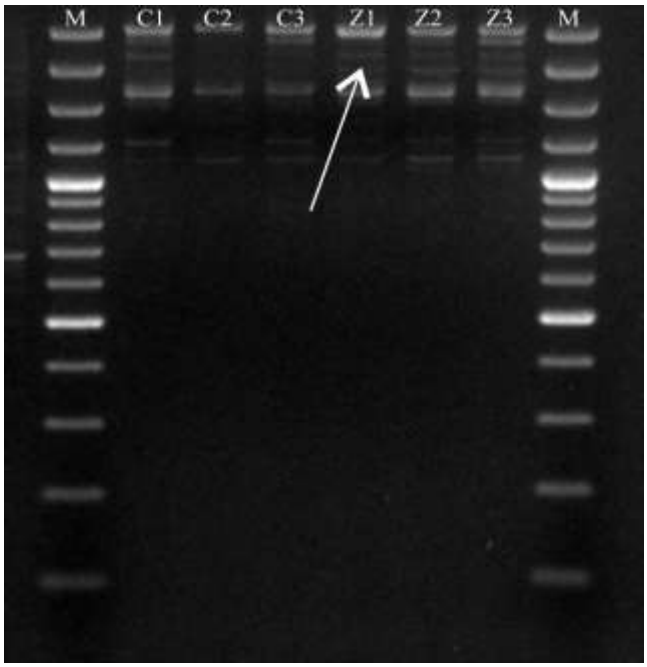
Przykładowe obrazy elektroforezy przedstawiają ryciny 2 – 6.



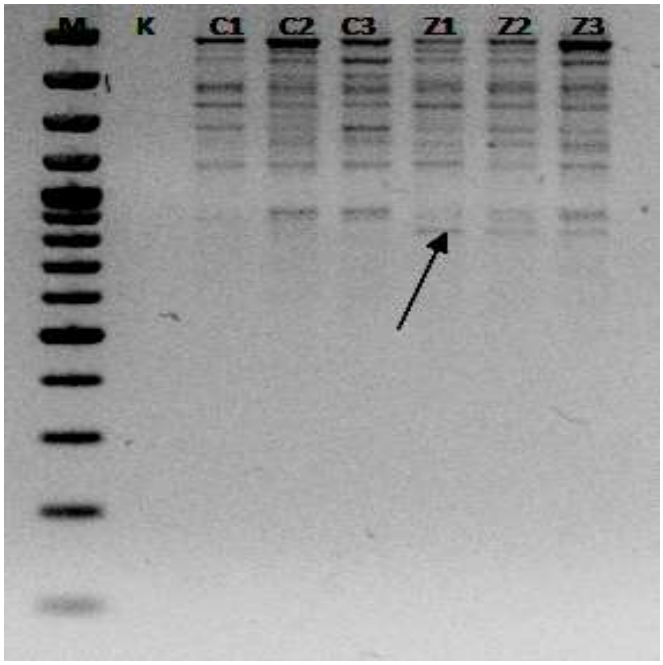
Ryc. 2. Obraz elektroforezy produktów amplifikacji przeprowadzonej dla startera L08 z użyciem mieszanin DNA uzyskanego z osobników wykazujących objawy chorobowe (C1, C2, C3) i osobników zdrowych (Z1, Z2, Z3), K – kontrola (bez DNA), M – marker – GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus. Strzałka wskazuje prążek monomorficzny dla chorych osobników jesionu.



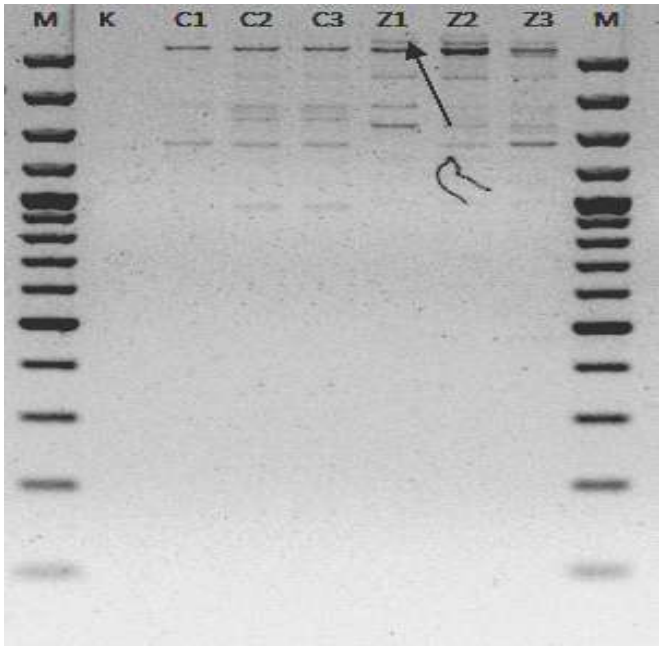
Ryc. 3. Obraz elektroforezy produktów amplifikacji przeprowadzonej dla startera AI01 z użyciem mieszanin DNA uzyskanego z osobników wykazujących objawy chorobowe (C1, C2, C3) i osobników zdrowych (Z1, Z2, Z3), K – kontrola (bez DNA), M – marker – GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus. Strzałka wskazuje prążek monomorficzny dla chorych osobników jesionu



Ryc. 4. Obraz elektroforezy produktów amplifikacji przeprowadzonej dla startera AI12 z użyciem mieszanin DNA uzyskanego z osobników wykazujących objawy chorobowe (C1, C2, C3) i osobników zdrowych (Z1, Z2, Z3), K – kontrola (bez DNA), M – marker – GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus. Strzałka wskazuje prążek monomorficzny dla zdrowych osobników jesionu



Ryc. 5. Obraz elektroforezy produktów amplifikacji przeprowadzonej dla startera T20 z użyciem mieszanin DNA uzyskanego z osobników wykazujących objawy chorobowe (C1, C2, C3) i osobników zdrowych (Z1, Z2, Z3), K – kontrola (bez DNA), M – marker – GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus. Strzałka wskazuje prążek monomorficzny dla zdrowych osobników jesionu



Ryc. 6. Obraz elektroforezy produktów amplifikacji przeprowadzonej dla startera V03 z użyciem mieszanin DNA uzyskanego z osobników wykazujących objawy chorobowe (C1, C2, C3) i osobników zdrowych (Z1, Z2, Z3), K – kontrola (bez DNA), M – marker – GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus. Strzałka wskazuje prążek monomorficzny dla zdrowych osobników jesionu

Przeprowadzenie wstępnego testowania działania markerów na wybranych powierzchniach

Na podstawie wykonanych analiz wybrano markery występujące z częstotliwością co najmniej 90% u jednej grupy osobników jesionu (porażonych przez chorobę lub nie wykazujących symptomów choroby) i nie występujących u osobników drugiej grupy lub występujących u maksymalnie jednego osobnika. Markery otrzymano dla populacji jesionu pochodzących z Nadleśnictw: Rokita, Stary Sącz i Miechów. Starterami dającymi te markery były: A02, G11, I13, L08, L14, M20, T20, AC03.

Zestawienie uzyskanych markerów, ich długości, grup osobników (chore lub zdrowe), u których stwierdzono marker i pochodzenia populacji, dla której marker występował z częstotliwością powyżej 90% przedstawia poniższa tabela.

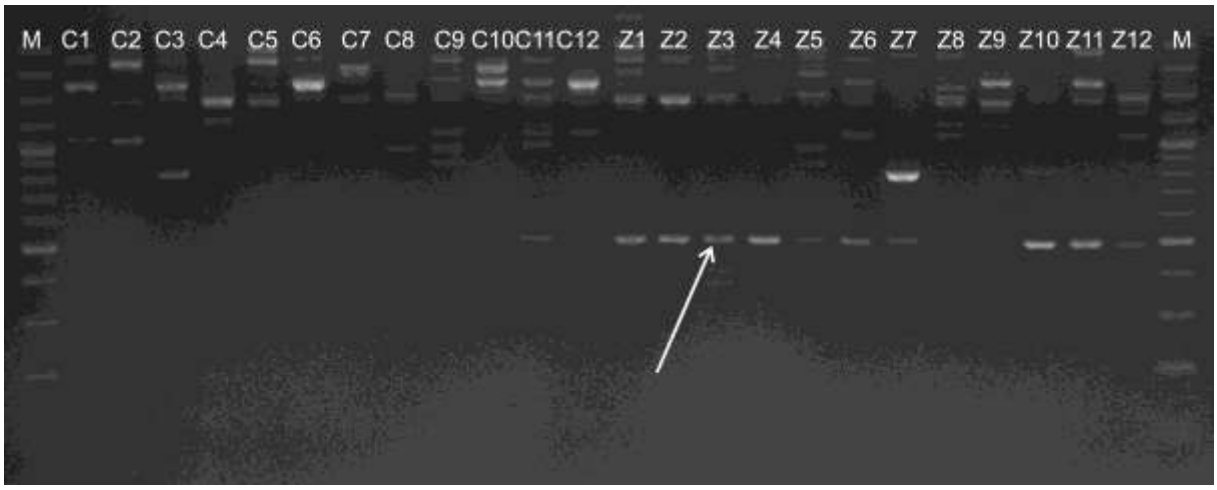
Zestawienie i charakterystyka markerów molekularnych pozwalających na odróżnienie osobników jesionu odpornych od osobników wrażliwych na zamieranie

L. p.	Nazwa markera	Nazwa startera	Długość markera [pary zasad]	Grupa osobników[1]	Pochodzenie populacji[2]
1	R_A02	A02	800	C	Nadleśnictwo Rokita, pow. II
2	SS_G11	G11	1500	C	Nadleśnictwo Stary Sącz
3	SS_I13	I13	550	Z	Nadleśnictwo Stary Sącz
4	M_L08	L08	270	C	Nadleśnictwo Miechów
5	M_L14	L14	500	Z	Nadleśnictwo Miechów
6	R_M20	M20	600	Z	Nadleśnictwo Rokita, pow. II
7	M_T20	T20	900	Z	Nadleśnictwo Miechów
8	R_AC03	AC03	210	Z	Nadleśnictwo Rokita, pow. I

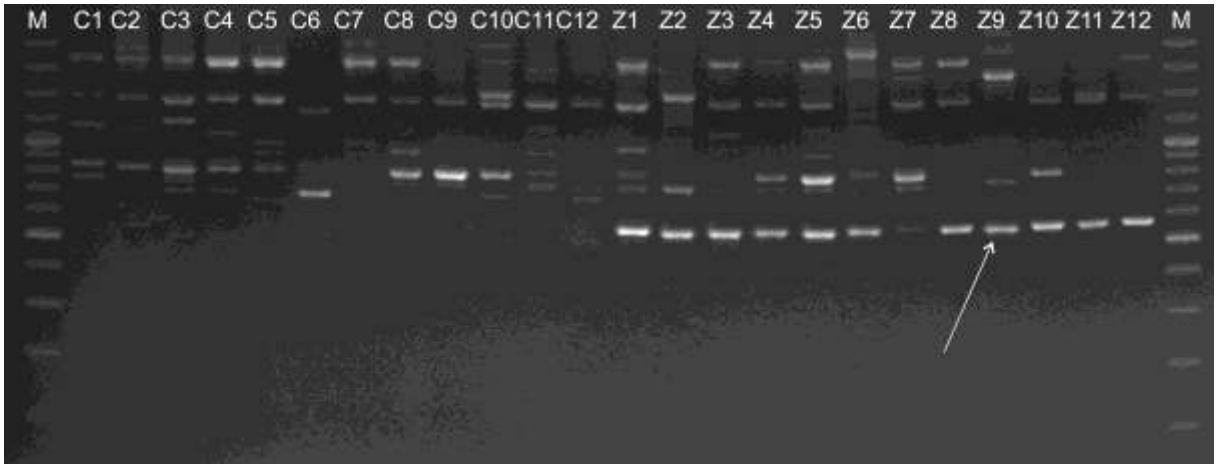
[1] – C – chore (z objawami zamierania), Z – zdrowe (nie wykazujące symptomów choroby)

[2] – pochodzenie populacji, dla której marker występował u więcej niż 90% osobników jesionu

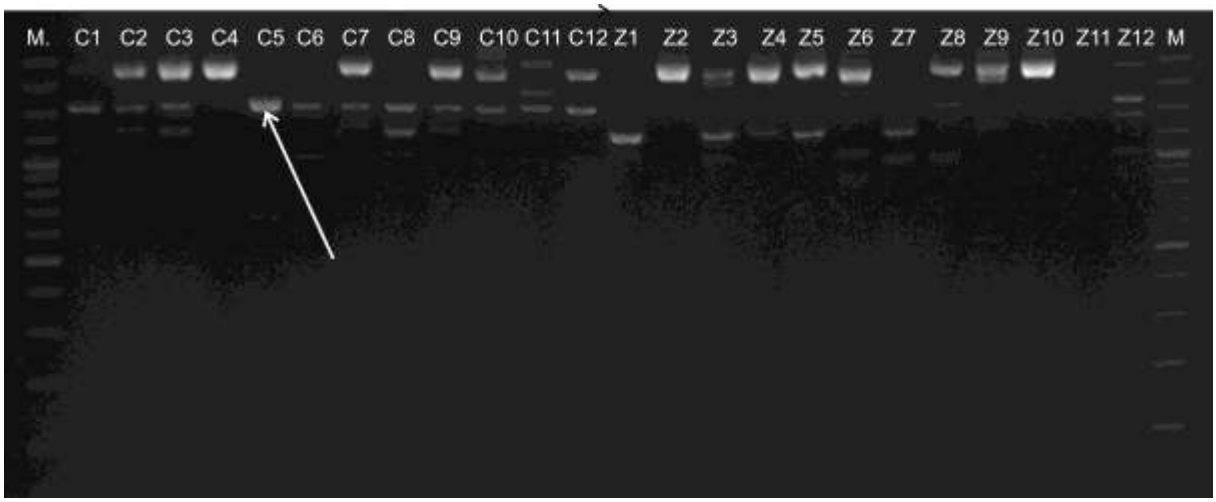
Pozostałe z testowanych starterów wykazały losowe rozmieszczenie markerów w grupie osobników porażonych i nie wykazujących symptomów choroby. Ryciny 7, 8 i 9 przedstawiają przykładowe obrazy elektroforezy dla osobników porażonych i zdrowych uzyskane w wyniku zastosowania niektórych z wymienionych starterów.



Ryc. 7. Obraz elektroforezy przeprowadzonej z użyciem startera L14 dla osobników jesionu z Nadleśnictwa Miechów wykazujących objawy chorobowe (C1 – C12) i osobników zdrowych (Z1 – Z11), K – kontrola (bez DNA), M – marker. Strzałka wskazuje prążek monomorficzny dla zdrowych osobników jesionu.



Ryc. 8. Obraz elektroforezy przeprowadzonej z użyciem startera I13 dla osobników jesionu z Nadleśnictwa Stary Sącz wykazujących objawy chorobowe (C1 – C12) i osobników zdrowych (Z1 – Z11), K – kontrola (bez DNA), M – marker. Strzałka wskazuje prążek monomorficzny dla zdrowych osobników jesionu.



Ryc. 9 . Obraz elektroforezy przeprowadzonej z użyciem startera G11 dla osobników jesionu z Nadleśnictwa Stary Sącz wykazujących objawy chorobowe (C1 – C12) i osobników zdrowych (Z1 – Z11), K – kontrola (bez DNA), M – marker. Strzałka wskazuje prążek monomorficzny dla chorych osobników jesionu.

Częstotliwość występowania markerów w poszczególnych populacjach była zróżnicowana i zależna od ich odległości geograficznej. Markery występujące w danej populacji u określonej grupy osobników (chorych lub bez symptomów zamierania) z dużą częstotliwością w pozostałych populacjach występowały u mniejszej liczby osobników. Spadek częstotliwości zależny był od odległości geograficznej populacji o najwyższej częstotliwości występowania markera od pozostałych populacji. Częstotliwość występowania markerów dla czterech populacji jesionu przedstawia poniższa tabela (dane dla populacji, w której marker występował u więcej niż 90% osobników pogrubiono).

Zestawienie i częstotliwość występowania markerów dla czterech populacji jesionu

L. p.	Nazwa markera	Częstotliwość markerów u osobników jesionu z Nadleśnictw[1]							
		Rokita		Staszów		Miechów		Stary Sącz	
		C[2]	Z[2]	C	Z	C	Z	C	Z
1	R_A02	**11**	**1**	8	2	5	2	5	3
2	SS_G11	5	8	7	1	8	1	**11**	**0**
3	SS_I13	2	1	7	6	5	8	**0**	**12**
4	M_L08	5	9	8	2	**12**	**0**	10	3
5	M_L14	5	5	2	7	**1**	**11**	5	8
6	R_M20	**1**	**11**	5	6	7	2	7	1
7	M_T20	9	3	9	8	**1**	**11**	3	12
8	R_AC03	**0**	**12**	0	0	0	0	0	0

[1] -częstotliwość występowania markerów wyrażona jako liczba osobników wykazujących obecność markera na 12 badanych osobników jesionu [2] – C – chore (z objawami zamierania), Z – zdrowe (nie wykazujące symptomów choroby)

Na przykład marker generowany w reakcji PCR z udziałem startera T20 występował w populacji z Nadleśnictwa Miechów u 90% zdrowych osobników. W populacji z Nadleśnictwa Staszów występował on z częstotliwością prawie 70%, natomiast w populacji z Nadleśnictwa Rokita jego częstotliwość wynosiła jedynie 25%. Ponadto w miarę spadku częstotliwości markerów u zdrowych osobników następował ich wzrost u osobników z objawami choroby. Podobnie zachowywało się większość markerów uzyskanych przy użyciu innych starterów. Oznacza to, że markery były charakterystyczne dla poszczególnych populacji (regionów występowania) jesionu, natomiast nie pozwalały na identyfikację odpornych osobników w obrębie całego gatunku.

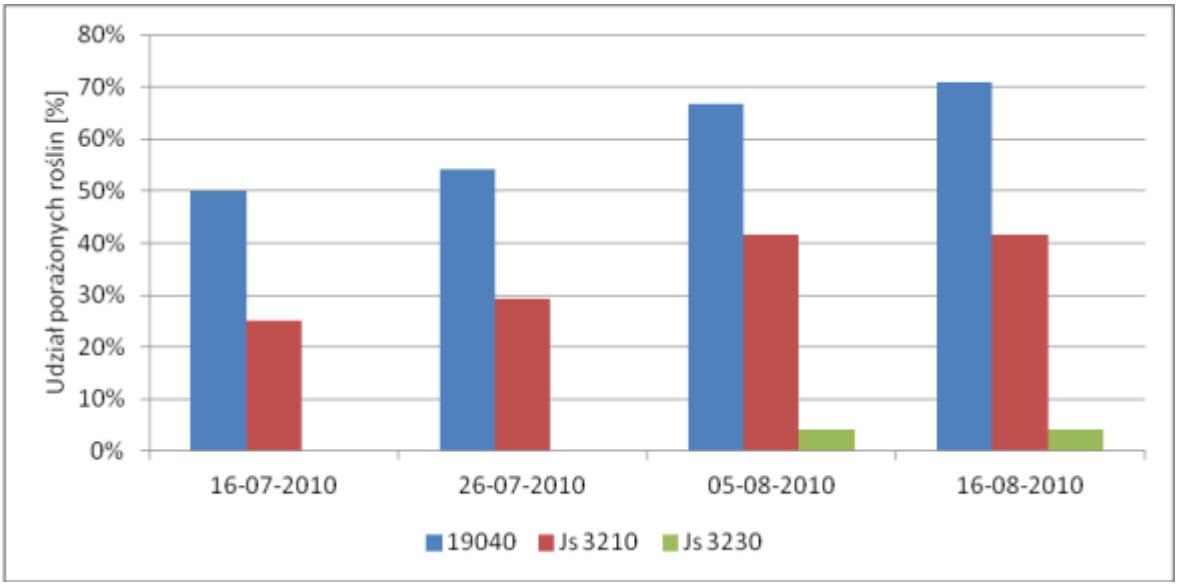
Testowania działania markerów na wyselekcjonowanych przez sztuczną inokulację szczepami grzyba patogenicznego Chalara fraxinea osobnikach jesionu

Ze względu na stwierdzenie nielicznych osobników jesionu reprezentujących populację z Nadleśnictwa Rokita wykazujących w okresie od 16.07 do 16.08.2010 roku objawy zamierania (5 osobników na 72 szczepionych) poniżej przedstawiono wyniki frekwencji roślin z objawami infekcji stwierdzone w 2010 roku tylko dla populacji z Nadleśnictwa Staszów. Osobniki jesionu wykazywały zróżnicowaną tolerancję na infekcję. Na podstawie wartości wskaźnika tolerancji podzielono je na grupy różniące się reakcją na szczepienie grzybem. W zależności od pochodzenia zastosowanego szczepu, w poszczególnych terminach obserwacji uzyskano różne wartości wskaźnika tolerancji, średnich długości nekroz i liczby porażonych roślin.

Najbardziej patogenicznym szczepem okazał się szczep pochodzący ze Staszowa, natomiast mniej patogenicznymi szczepy z Nadleśnictwa Rokita i Nadleśnictwa Stary Sącz. Świadczy o tym dynamika pojawiania się roślin z objawami więdnięcia liści i następnie zamierającymi wierzchołkami pędów oraz długość nekroz. Tabela przedstawia liczby osobników jesionu wykazujących objawy więdnięcia liści.

Zmiany frekwencji roślin jesionu wykazujących objawy więdnięcia liści i zamierania wierzchołkowej części pędu w zależności od pochodzenia szczepu *Chalara fraxinea* zastosowanego do inokulacji

Numer i pochodzenie szczepu	Data obserwacji			
	16.07.2010	26.07.2010	05.08.2010	16.08.2010
19040 Nadl. Staszów	12	13	16	17
Js 3210 Nadl. Rokita	6	7	10	10
Js 3230 Nadl. Stary Sącz	0	0	1	1
Kontrola	0	0	0	0



Ryc. 10. Procentowy udział porażonych roślin jesionu w zależności od pochodzenia szczepu *Chalara fraxinea* zastosowanego do szczepienia

Udział porażonych roślin jesionu w zależności od pochodzenia szczepu przedstawia Ryc. 11. Wszystkie osobniki, u których stwierdzono więdnięcie liści wykazywały również obecność nekroz o różnej długości. Jednocześnie stwierdzono występowanie niewielkiej liczby roślin nie wykazujących objawów więdnięcia liści, natomiast charakteryzujących się obecnością niewielkich nekroz.

Dla każdego osobnika obliczono wskaźnik tolerancji na infekcję grzybem. W zależności od zastosowanego szczepu grzyba określono liczbę osobników charakteryzujących się danym wskaźnikiem tolerancji. W ten sposób uzyskano grupy osobników o różnej tolerancji na infekcję. Podobnie jak w przypadku liczby roślin wykazujących więdnięcie liści i zamieranie wierzchołków roślin najwięcej osobników jesionu charakteryzujących się najwyższym wskaźnikiem tolerancji (najbardziej porażonych) stwierdzono w przypadku stosowania szczepu pochodzącego z Nadleśnictwa Staszów. Szczep z Nadleśnictwa Stary Sącz nie powodował symptomów zamierania u badanej populacji. Tabela przedstawia frekwencję osobników jesionu w zależności od wartości wskaźnika tolerancji i pochodzenia szczepu *Chalara fraxinea*.

Frekwencja osobników jesionu z Nadleśnictwa Staszów w zależności od wartości wskaźnika tolerancji i pochodzenia szczepu *Chalara fraxinea* zastosowanego do szczepienia

Numer i pochodzenie szczepu	Wartość wskaźnika tolerancji				
	0	1	2	3	4
19040 Nadl. Staszów	7	1	3	1	12
Js 3210 Nadl. Rokita	15	1	3	0	5
Js 3230 Nadl. Stary Sącz	23	0	1	0	0

Obliczono średnią długość nekroz występujących w grupach osobników o różnej wartości wskaźnika tolerancji (tabela poniżej).

Średnia długość nekroz [mm] występujących na pędach jesionów w zależności od wartości wskaźnika tolerancji (pomiar dokonany 07.10.2010)

Wskaźnik tolerancji				
0	1	2	3	4
24.5	33.3	44.0	bo	63.1

bo – brak osobników

Dla wykazania zależności między wskaźnikiem tolerancji a długością obserwowanych nekroz u poszczególnych osobników dla roślin, u których zastosowano szczep pochodzący z Nadleśnictwa Staszów (19040) i Nadleśnictwa Rokita (Js 3210) obliczono odpowiednie współczynniki korelacji.

Współczynniki korelacji Pearsona między wskaźnikiem tolerancji, a długością obserwowanych nekroz w zależności od szczepu *Chalara fraxinea* zastosowanego do szczepienia

Numer szczepu	Współczynnik korelacji (r)	Prawdopodobieństwo
19040 Nadl. Staszów	0.677	P<0.001
Js 3210 Nadl. Rokita	0.737	P<0.001
Ogólnie	0.754	P<0.001

Obserwacje wykonane na wiosnę 2011 roku wykazały, że symptomy zamierania wystąpiły zarówno u osobników z Nadleśnictwa Staszów jak i u osobników z Nadleśnictwa Rokita. Stwierdzono, że badane populacje nie różniły się statystycznie pod względem liczby osobników, którym przypisano poszczególne oceny przeżywalności. W przypadku obu populacji udział osobników wykazujących określony poziom odporności na infekcję grzybem był podobny. Należy jednak podkreślić, że objawy zamierania u populacji z Nadleśnictwa Rokita w przypadku wszystkich stosowanych szczepów wystąpiły dopiero na wiosnę następnego roku, a nie jak w przypadku populacji z Nadleśnictwa Staszów po miesiącu od szczepienia. Około 22% osobników nie wykazywało symptomów choroby. Około 65% osobników wykazywało obecność nekroz i zamieranie wierzchołka pędów, natomiast około 13% zamierało. Frekwencję osobników jesionu dla populacji z Nadleśnictwa Staszów i Rokita po 12 miesiącach od szczepienia w zależności od wartości wskaźnika tolerancji i pochodzenia szczepu *Chalara fraxinea* przedstawia tabela.

Liczba osobników jesionu w zależności od ich tolerancji na infekcję i pochodzenia szczepu *Chalara fraxinea*.

Numer i pochodzenie szczepu	Nadleśnictwo					
	Staszów			Rokita		
	Ocena					
	0	**1**	**2**	**0**	**1**	**2**
19040, Nadl. Staszów	3	18	3	6	15	3
Js 3210, Nadl. Rokita	8	14	2	6	15	3
Js 3230, Nadl. Stary Sącz	6	15	3	4	15	5
Razem	17	47	8	16	45	11

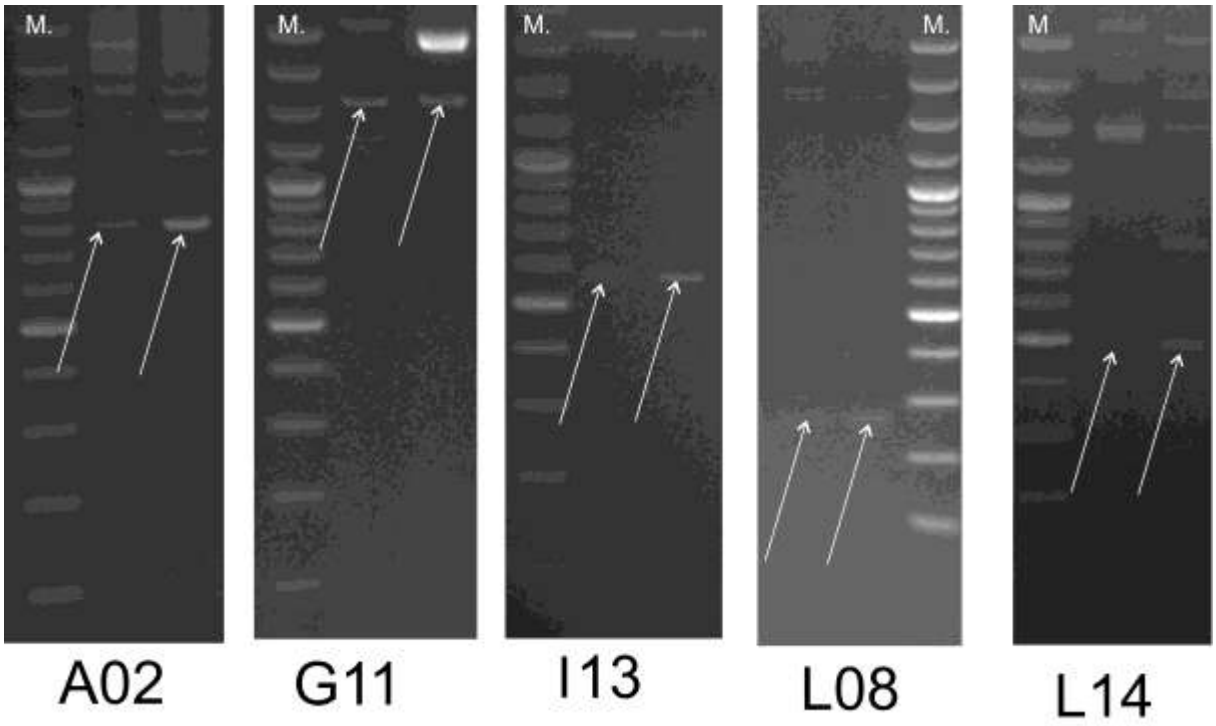
Analizy molekularne

Przeprowadzono reakcje PCR dla osobników jesionu o znanej na podstawie sztucznej inokulacji tolerancji na infekcję przez *Chalara fraxinea*. Obecność markerów u osobników jesionu była

zgodna z wynikami oceny tolerancji tych osobników na infekcję uzyskanej w wyniku sztucznej inokulacji pędów. Analizy wykazały obecność markerów u 1 (2.2%) osobnika charakteryzującego się brakiem lub niską tolerancją na infekcję (oceny 1 i 2 uzyskane przy sztucznej inokulacji). Stwierdzono obecność markera u 13 osobników nie wykazujących symptomów zamierania (ocena 0 uzyskana przy sztucznej inokulacji) na 14 badanych. Uzyskane wyniki potwierdzają użyteczność markera dla odróżnienia jesionów tolerancyjnych od wrażliwych na infekcję.

Opracowanie markerów SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions)

Uzyskane markery powstały w reakcji PCR przy zastosowaniu niespecyficznych starterów RAPD. Dla zwiększenia ich specyficzności wykonano klonowanie i sekwencjonowanie odpowiednich produktów reakcji PCR. W ten sposób uzyskano tzw. markery SCAR (Sequence Characterized Amplified Region). Dzięki temu użyteczność uzyskanych markerów została zwiększona (Sztuba-Solińska 2005). W wyniku reakcji PCR z użyciem polimerazy Pwo uzyskano fragmenty DNA nadające się do klonowania. Obraz elektroforezy klonowanych markerów przedstawia Ryc. 11.



Ryc. 11. Klonowane markery molekularne pozwalające na odróżnienie osobników jesionu porażonych przez chorobę i nie wykazujących symptomów choroby. Strzałki pokazują położenie markera na elektroforogramie. Markery uzyskano w reakcji PCR przy zastosowaniu następujących starterów RAPD: A02, G11, I13, L08 i L14. M – marker długości fragmentów DNA – GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus.

Dla markerów: R_A02, SS_G11, SS_I13, M_L08, M_L14 uzyskano kolonie bakterii *Escherichia coli* z wklonowanymi markerami, a następnie wykonano sekwencjonowanie. Znajomość sekwencji markerów umożliwiła opracowanie specyficznych starterów (starterów SCAR), których zastosowanie w reakcji PCR umożliwia amplifikację specyficznych lokus.
Zestawienie sekwencji i charakterystykę starterów SCAR przedstawia poniższa tabela.

Charakterystyka i sekwencje starterów SCAR

L. p.	Nazwa markera	Nazwa startera	Sekwencja starterów (5' – 3')	Temp. topnienia [°C]	Długość produktu amplifikacji [par zasad]
1	R_A02	R_A02_F	TGCCAACGGCGTCCGTTCAA	59.8	636
		R_A02_R	ACGCCGATCCCATGTTCGCT	58.9	
2	SS_G11	SS_G11_F	AGGGAAGTCCCCACAAGTGGTC	57.8	1319
		SS_G11_R	TGGCAACGGATTGGTTTTGTGGA	57.7	
3	SS_I13	SS_I13_F	ACCAAATGGTTTAAAAGTGGTTGGGCT	57.9	515
		SS_I13_R	GGCTGCAACAGATGTCATAAAGGAAGC	58.8	
4	M_L08	M_L08_F	GCAGGTGGACAAAGTCGACGGG	60.0	258
		M_L08_R	AGCAGGTGGAGACGATGCGGA	60.0	
5	M_L14	M_L14_F	GCGCGGGAGGTTTTACGGCA	60.3	415
		M_L14_R	TCGCAAACTTGTTGCGACGGG	58.8	

Przeprowadzone przy użyciu powyższych starterów reakcje PCR z użyciem DNA osobników z określonej populacji potwierdziły amplifikację fragmentów DNA o podanych długościach. Umożliwia to odróżnienie odpornych i podatnych na infekcję przez *Chalara fraxinea* osobników jesionu pochodzących z analizowanych populacji.

Badanie rozkładu częstotliwości występowania markerów w wybranych populacjach jesionu

Analizy potwierdziły użyteczność uzyskanych markerów jako narzędzia wspomagającego odróżnienie osobników wrażliwych na zamieranie od osobników odpornych na chorobę. Przeprowadzone reakcje PCR na DNA wyekstrahowanym z liści i kory osobników z Nadleśnictwa Rokita umożliwiły powstanie markera R_A02 u 28 (93%) osobników chorych i 2 (6.6%) osobników zdrowych. Dla populacji z Nadleśnictwa Miechów marker M_L08 powstawał u wszystkich osobników chorych. Był on również obecny dla 1 (3.3%) osobnika zdrowego. W przypadku populacji z Nadleśnictwa Stary Sącz marker SS_I13 występował u wszystkich osobników zdrowych i 1 (3.3%) osobnika uznanego wstępnie jako podatny na zamieranie. Uzyskane wyniki potwierdzają możliwość stosowania wymienionych markerów do odróżniania

wrażliwych i odpornych osobników jesionu. Niektóre z markerów dają wprawdzie podstawy do błędnego zakwalifikowania osobnika do grupy jesionów wrażliwych (marker R_A02 i M_L08) lub odpornych (marker SS_I13), ale prawdopodobieństwo tego błędu jest bardzo małe.

Wybrane elementy biochemicznego podłoża odporności jesionu na porażenie przez Chalara fraxinea

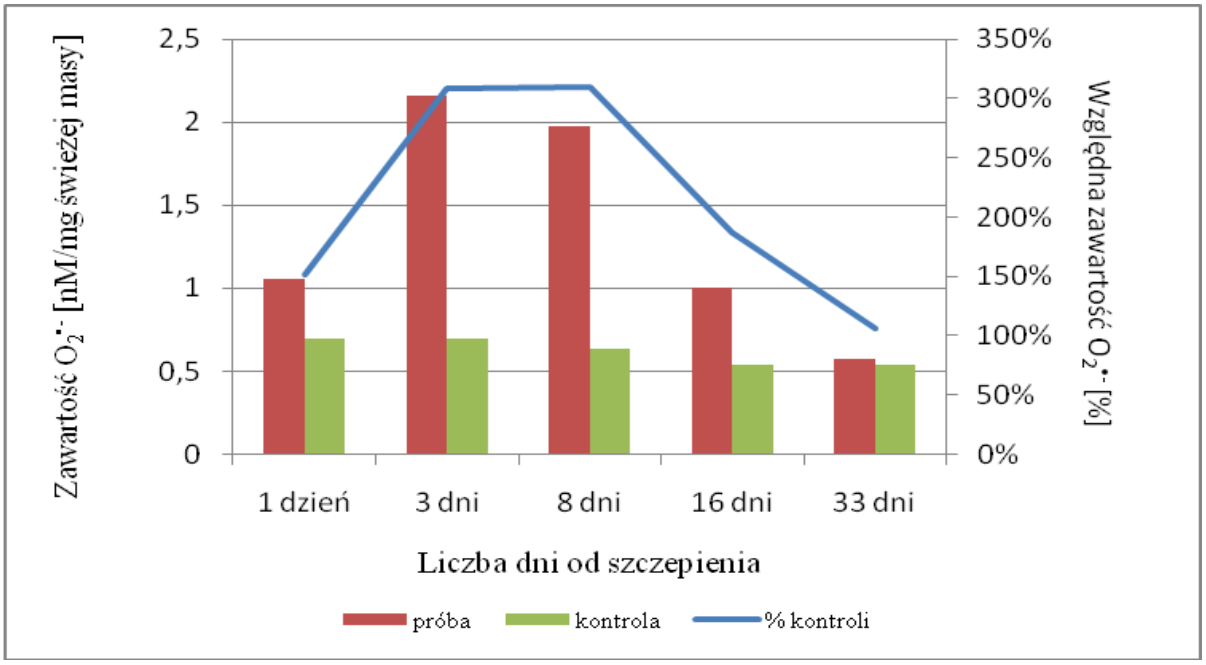
Badania wstępne

Nekrozy pojawiły się na pędach roślin po około 16 dniach od momentu szczepienia. Ich długość była zróżnicowana, uzależniona od tolerancji osobników na obecność patogena. Średnia długość nekroz u roślin wykazujących ich obecność po 16 i 33 dniach od szczepienia wynosiła odpowiednio 17,57 i 43,78 mm.

Rośliny jesionu reagowały na infekcję nagłym wzrostem stężenia anionorodnika ponadtlenkowego. Wysokie stężenie anionorodnika (około 2 nM/mg świeżej masy) utrzymywane było do około ósmego 8 dnia od momentu szczepienia. W następnych terminach pobierania prób (po 16 i 33 dniach) obserwowano spadek zawartości $O_2^{\bullet-}$. Różnice były statystycznie istotne dla P=0,005. Tabela przedstawia zmiany stężenia anionorodnika ponadtlenkowego w pędach roślin szczepionych *Chalara fraxinea*.

Stężenie anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\bullet-}$) w nM/mg świeżej masy w pędach roślin szczepionych *Chalara fraxinea*, pędach roślin kontrolnych i względna zawartość anionorodnika w stosunku do kontroli w procentach.

	Liczba dni od szczepienia				
	1 dzień	3 dni	8 dni	16 dni	33 dni
Rośliny szczepione	1.056	2.156	1.971	1.002	0.569
Rośliny kontrolne	0.698	0.700	0.636	0.536	0.536
Różnica	0.358	1.456	1.335	0.466	0.033
Względna zawartość anionorodnika ponadtlenkowego	151.40%	308.00%	309.83%	186.86%	106.21%



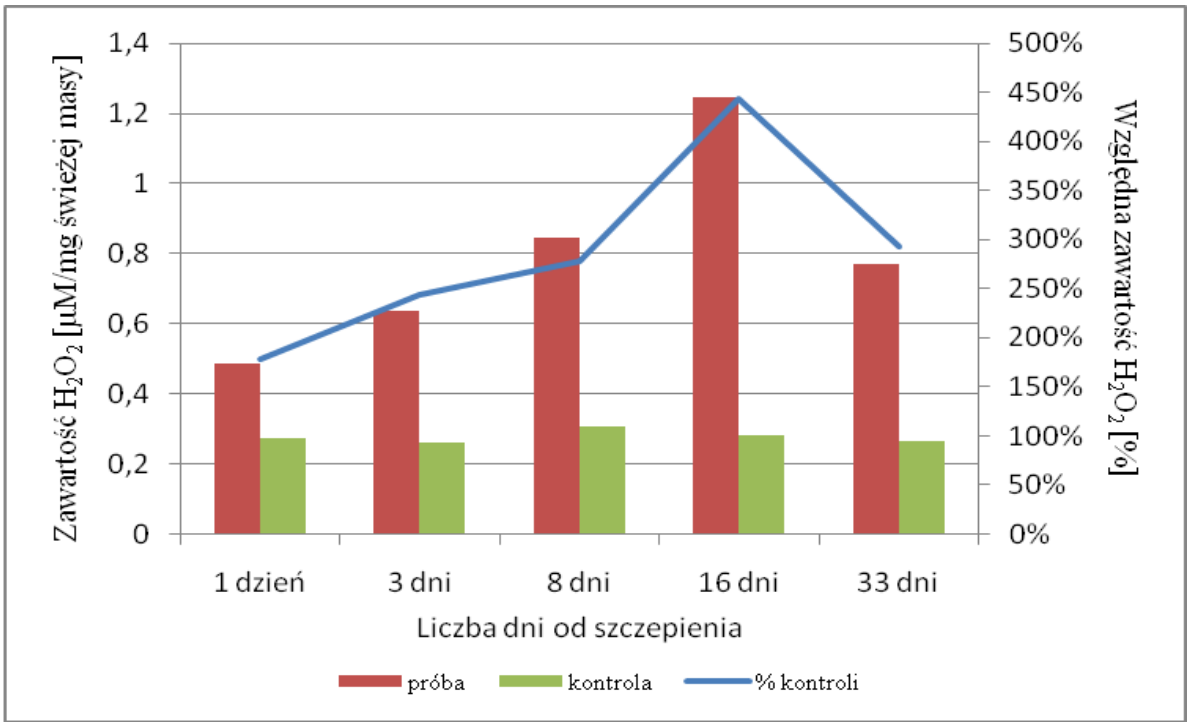
Ryc. 12. Zmiany stężenia anionorodnika ponadtlenkowego w pędach roślin szczepionych *Chalara fraxinea* i względna zawartość anionorodnika ponadtlenkowego w stosunku do pędów roślin kontrolnych.

Rozkład anionorodnika ponadtlenkowego odbywa się na drodze reakcji dysproporcjonowania (dysmutacji) z udziałem enzymu dysmutazy ponadtlenkowej. Wynikiem reakcji dysmutacji jest powstawania nadtlenku wodoru i tlenu. Ze względu na występowanie $O_2^{\bullet-}$ w zdrowych (kontrolnych) roślinach dla każdego terminu porównano zawartości anionorodnika u roślin szczepionych grzybem i roślin kontrolnych. Stwierdzono, że „wybuch tlenowy" spowodowany obecnością patogena doprowadził do trzykrotnego wzrostu jego zawartości w badanych pędach jesionu.

Badania wykazały statystycznie istotny wzrost stężenia nadtlenku wodoru w pędach roślin szczepionych w porównaniu do roślin kontrolnych. Rośliny różniły się również statystycznie zawartością H_2O_2 w poszczególnych terminach pobierania prób dla $P<0.001$. Najniższą zawartość H_2O_2 stwierdzono 1 dnia po szczepieniu (0,49 µM/mg świeżej masy). Obserwacje wykazały wzrost stężenia nadtlenku wodoru do 16 dnia, gdy osiągało ono maksimum tj. 1,25 µM/mg świeżej masy. Później zawartość H_2O_2 nieco spadała. Podobnie jak w przypadku anionorodnika ponadtlenkowego zawartość nadtlenku wodoru była kilka razy większa w porównaniu z roślinami kontrolnymi.

Stężenie nadtlenku wodoru (H_2O_2) w µM/mg świeżej masy w pędach roślin szczepionych *Chalara fraxinea*, pędach roślin kontrolnych i względna zawartość nadtlenku wodoru w stosunku do kontroli w procentach.

	Liczba dni od szczepienia				
	1 dzień	3 dni	8 dni	16 dni	33 dni
Rośliny szczepione	0.485	0.638	0.846	1.247	0.771
Rośliny kontrolne	0.272	0.261	0.305	0.281	0.263
Różnica	0.213	0.377	0.542	0.966	0.508
Względna zawartość nadtlenku wodoru	178.24%	244.40%	277.89%	443.52%	292.94%



Ryc. 13. Zmiany stężenia nadtlenku wodoru w pędach roślin szczepionych *Chalara fraxinea* i względna zawartość nadtlenku wodoru w stosunku do pędów roślin kontrolnych.

Biorąc pod uwagę zmiany zawartości obu cząstek aktywnego tlenu w szczepionych pędach należy stwierdzić, że szczepione rośliny jesionu w reakcji na obecność patogena tworzą cząstki anionorodnika ponadtlenkowego. Jest on cząstką bardzo reaktywną, ale stosunkowo szybko ulega rozpadowi w wyniku reakcji dysmutacji, co przy spadku jego stężenia prowadzi do wzrostu zawartości nadtlenku wodoru.

Stwierdzono, że bardziej odporne na patogena osobniki jesionu charakteryzują się większą zawartością aktywnych form tlenu. Rośliny, u których stwierdzono występowanie krótszych nekroz

wytwarzały w poszczególnych terminach więcej zarówno anionorodnika ponadtlenkowego jak i nadtlenku wodoru (współczynniki korelacji odpowiednio -0.463, P=0.009 i -0.446, P=0.012).

Biochemiczna odpowiedź osobników jesionu różniących się tolerancją na porażenie przez Chalara fraxinea

Reizolacja wykonana z inokulowanych jesionów wykazała obecność patogena w powstałych nekrozach.

Na podstawie długości nekroz powstałych w ciągu 7 miesięcy od szczepienia wykazano duże różnice między badanymi osobnikami pod względem tolerancji na infekcję. Obserwacja ta umożliwiła wyróżnienie trzech klas osobników jesionu charakteryzujących się zróżnicowaną tolerancją na infekcję przez *Chalara fraxinea*. Nekrozy na infekowanych pędach pojawiły się po około 20 dniach od szczepienia. Na podstawie analizy statystycznej długości nekroz i jej rozkładu w badanej populacji określono dla poszczególnych klas zakres długości nekroz będących podstawą do zakwalifikowania danego osobnika do określonej klasy tolerancji na infekcję przez patogena. Przyjęto następujące zakresy długości nekroz (w mm) dla poszczególnych klas tolerancji:

I 35 – 60

II 64 – 90

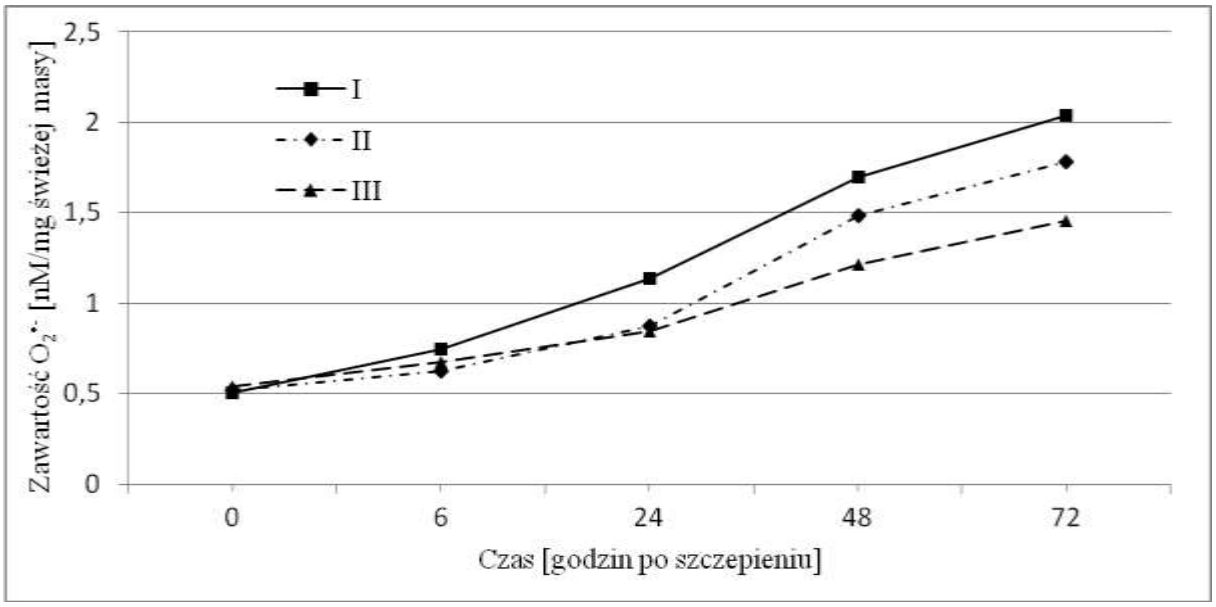
III 100 - 194

Wyróżnienie grup roślin o różnej tolerancji na infekcję przez *Chalara fraxinea* umożliwiło analizę biochemicznej reakcji odpornych i wrażliwych osobników na obecność patogena.

Zawartość anionorodnika ponadtlenkowego

Osobniki wyróżnionych klas tolerancji charakteryzowały się podobną wyjściową zawartością anionorodnika (kontrola) wynoszącą około 0.5 nM/mg świeżej masy pędu. W miarę upływu czasu od szczepienia grzybem następował szybki wzrost jego zawartości. Osobniki wszystkich klas tolerancji osiągały najwyższą zawartość anionorodnika po 72 godzinach od szczepienia. Wyróżnione klasy różniły się zarówno maksymalnym osiąganym stężeniem tej formy ROS jak i szybkością jego gromadzenia w tkankach pędu roślin. Osobniki o największej odporności na infekcję charakteryzowały się najszybszą akumulacją anionorodnika i najwyższą maksymalną jego zawartością – 2.04 nM/mg świeżej masy. Stężenie anionorodnika u najbardziej tolerancyjnych osobników było statystycznie wyższe w porównaniu z osobnikami wrażliwymi. Stwierdzono, że największy przyrost stężenia anionorodnika miał miejsce w okresie między 24 a 48 godziną od infekcji dla wszystkich grup osobników. Badania wykazały, że względna zawartość anionorodnika u badanych grup roślin (zawartość anionorodnika w stosunku do roślin kontrolnych) malała wraz ze spadkiem tolerancji osobników na zakażenie (odpowiednio 404, 345 i 269%). Dynamikę

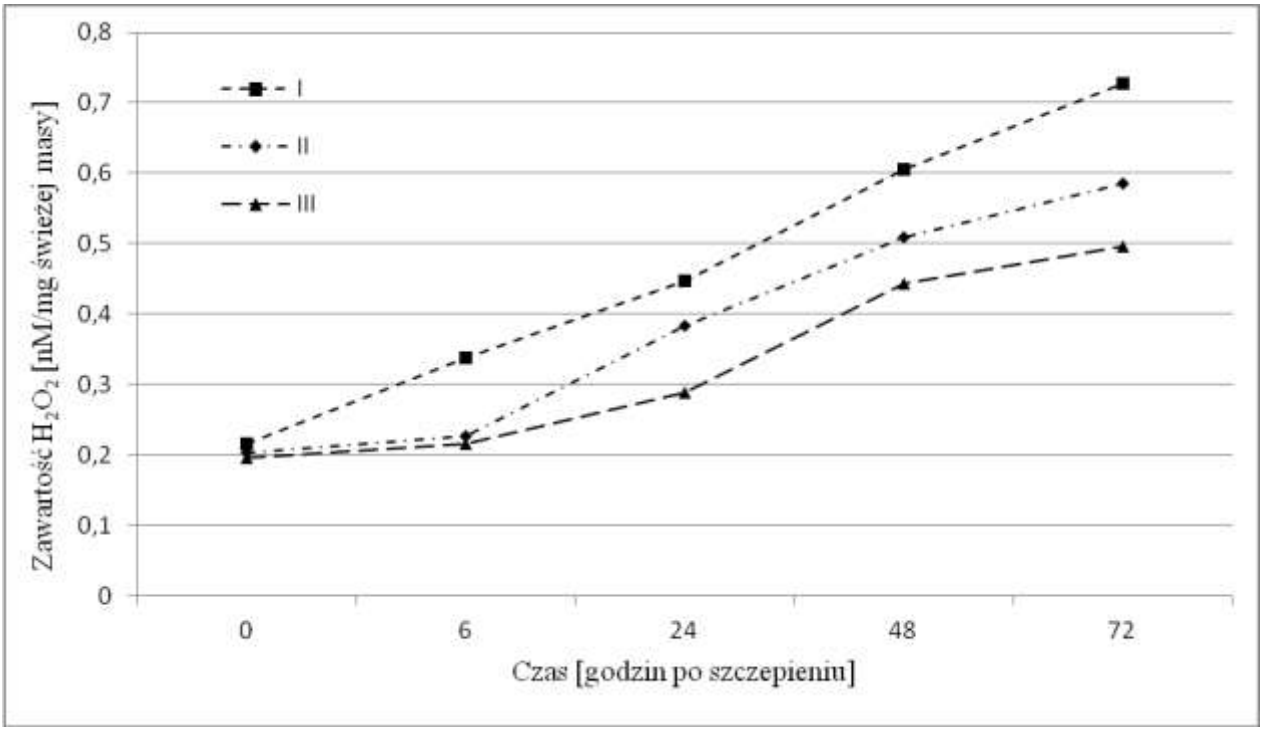
przyrostu zawartości anionorodnika ponadtlenkowego u roslin różniących się tolerancją na infekcję przez *Chalara fraxinea* przedstawia rycina 14.



Ryc. 14. Zmiany stężenia anionorodnika ponadtlenkowego [nM/mg świeżej masy] w pędach roślin jesionu szczepionych *Chalara fraxinea*, I, II, III – klasy tolerancji na infekcję.

Zawartość nadtlenku wodoru

Szczepienie pędów jesionu powodowało wzrost zawartości nadtlenku wodoru u wszystkich grup osobników. Najszybciej nadtlenek wodoru był akumulowany w pędach najbardziej odpornych na infekcję osobników. Osobniki mniej odporne charakteryzowały się wolniejszym gromadzeniem nadtlenku wodoru, zwłaszcza w początkowym okresie po infekcji. O ile osobniki tolerujące grzyba (I klasa) najbardziej intensywnie gromadziły H_2O_2 już po 6 godzinach od szczepienia to bardziej wrażliwe wykazywały najszybszy wzrost jego stężenia dopiero po 24 (II klasa) i 48 (III klasa) godzinach od szczepienia. Wszystkie grupy osobników osiągały maksymalne stężenie nadtlenku wodoru po 72 godzinach. Zależało ono od tolerancji roślin na infekcję i malało wraz z jej spadkiem (odpowiednio 0.73, 0.59 i 0.50 nM/mg świeżej masy). Względną zawartość nadtlenku wodoru dla wyróżnionych grup roślin wynosiła odpowiednio: 336, 287 i 254%. Dynamikę przyrostu zawartości nadtlenku wodoru u roślin różniących się tolerancją na infekcję przez *Chalara fraxinea* przedstawia rycina 15.

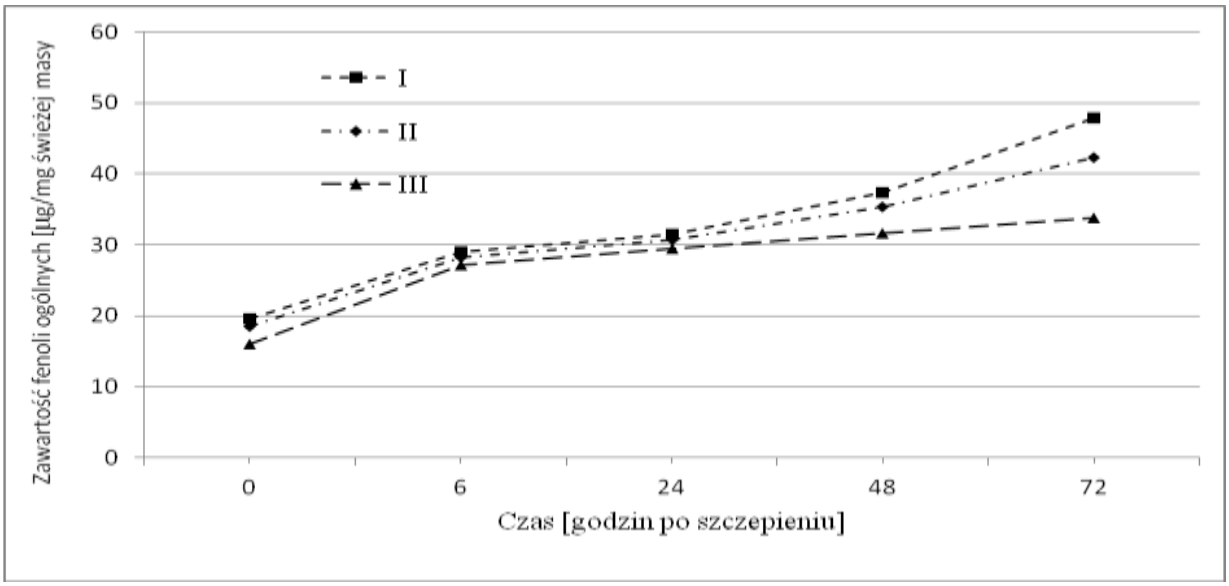


Ryc. 15. Zmiany stężenia nadtlenku wodoru w pędach roślin szczepionych *Chalara fraxinea*, I, II, III - klasy tolerancji na infekcję.

Zawartość fenoli ogólnych i flawonoidów

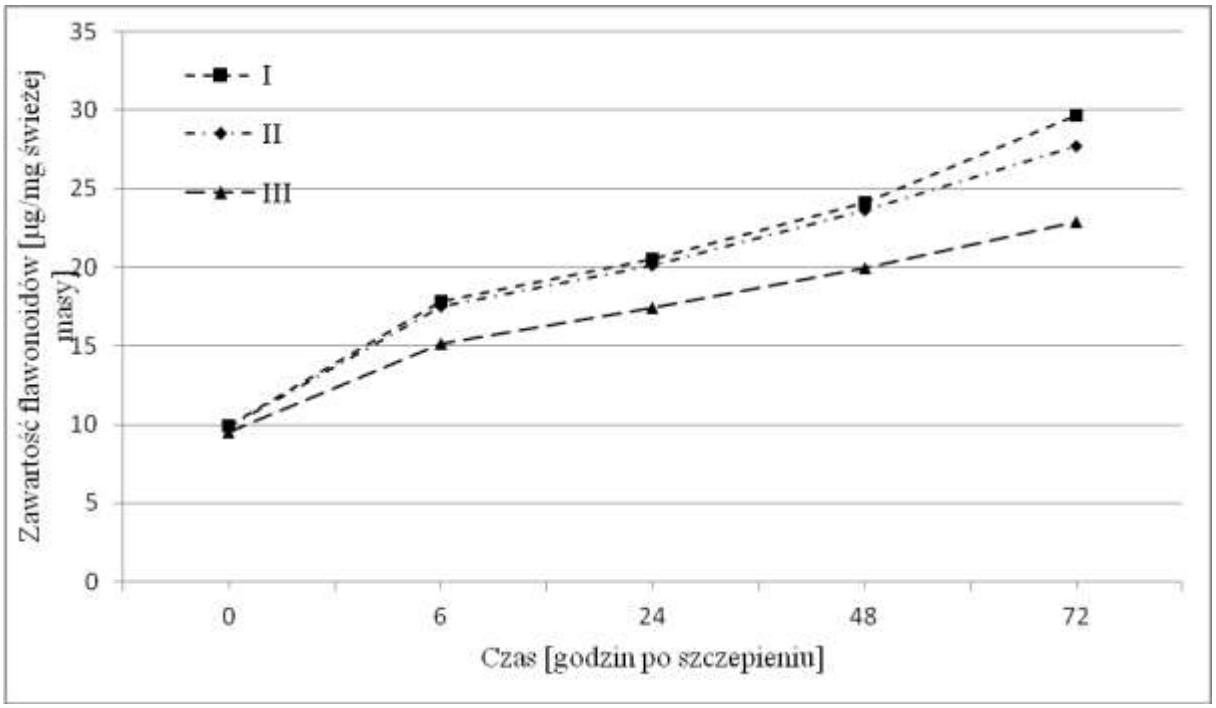
Badania wykazały znaczny wzrost zawartości fenoli ogólnych i flawonoidów w wyniku szczepienia badanych grup roślin grzybem *Chalara fraxinea*. Dynamika wzrostu i maksymalna zawartość tych związków była różna w zależności od stwierdzonej tolerancji na infekcję przez patogena. W przypadku fenoli ogólnych wzrost ich stężenia był podobny w ciągu 24 godzin od szczepienia dla wszystkich klas osobników. Po tym czasie rośliny o większej tolerancji na infekcję wykazywały istotnie szybszą akumulację fenoli. Dynamikę przyrostu zawartości fenoli ogólnych u roślin różniących się tolerancją na infekcję przez *Chalara fraxinea* przedstawia rycina 16.

Dwie najbardziej tolerancyjne grupy osobników jesionu (klasa I i II) wykazywały podobny poziom flawonoidów do 48 godzin po szczepieniu grzybem. Różnice między tymi grupami występowały dopiero po 72 godzinach od szczepienia. Osobniki najbardziej wrażliwe (klasa III) wykazywały przez cały okres prowadzenia doświadczenia (72 godziny) istotnie niższy poziom flawonoidów. W miarę upływu czasu różnica stężeń między osobnikami tolerancyjnymi (klasy I i II) i wrażliwymi



Ryc. 16. Zmiany stężenia fenoli ogólnych w pędach roślin szczepionych *Chalara fraxinea*, I, II, III - klasy tolerancji na infekcję.

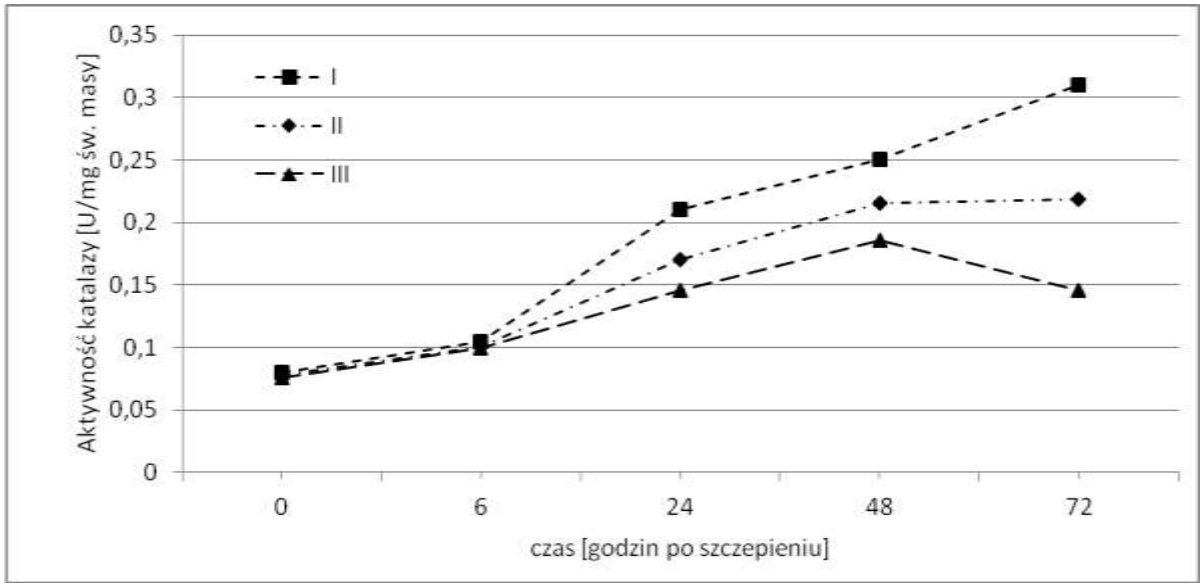
(klasa I) była coraz większa. Dynamikę przyrostu zawartości flawonoidów u roślin różniących się tolerancją na infekcję przez *Chalara fraxinea* przedstawia rycina 17.



Ryc. 17. Zmiany stężenia flawonoidów w pędach roślin szczepionych *Chalara fraxinea*, I, II, III - klasy tolerancji na infekcję.

Aktywność katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej

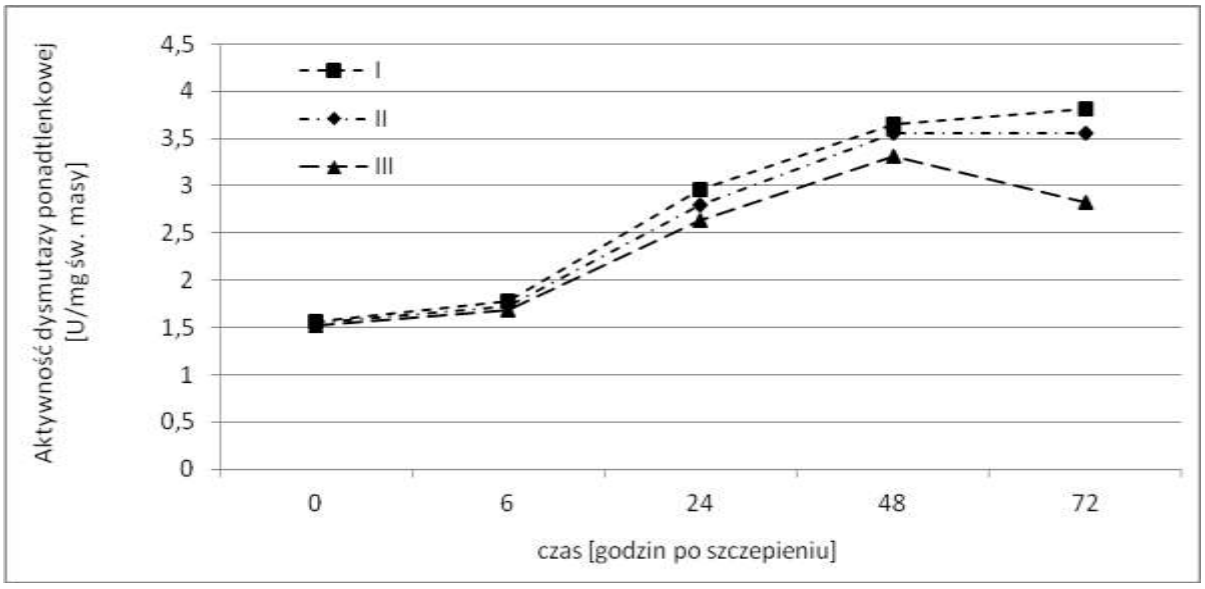
W przypadku jesionów o mniejszej tolerancji na infekcję aktywność katalazy rosła od 6 godziny od infekcji, maksimum osiągała po 48 godzinach, a następnie spadała. Maksymalna aktywność enzymu wynosiła 0.186 U/mg świeżej masy. Początek wzrostu aktywności katalazy u osobników najbardziej tolerancyjnych na infekcję miał również miejsce około 6 godzin po szczepieniu. Osobniki te wykazywały jednak ciągły wzrost aktywności enzymu. Aktywność enzymu po 48 godzinach osiągała wartość 0.25 U/mg świeżej masy, co stanowiło 134% aktywności katalazy dla osobników o najmniejszej tolerancji na infekcję. Po 72 godzinach tolerancyjne osobniki charakteryzowały się aktywnością równą 0.31 U/mg świeżej masy co oznaczało około dwukrotnie większą aktywność w porównaniu z osobnikami o mniejszej tolerancji (Ryc.18).



Ryc. 18. Zmiany aktywności katalazy w pędach roślin szczepionych *Chalara fraxinea*, I, II, III - klasy tolerancji na infekcję.

Podobny profil aktywności enzymatycznej występował w przypadku dysmutazy ponadtlenkowej. Osobniki bardziej tolerancyjne na infekcję przez *Chalara fraxinea* charakteryzowały się większą aktywnością i ciągłym jej wzrostem w okresie po sztucznej inokulacji. Początkowa aktywność enzymu była taka sama dla wszystkich wyróżnionych grup osobników jesionu i wynosiła około 1.5 U/mg świeżej masy. Najmniej tolerancyjne jesiony wykazywały wzrost aktywności dysmutazy ponadtlenkowej od około 6 godziny po szczepieniu. Po 48 godzinach aktywność enzymu osiągała maksimum (około 3.3 U/mg świeżej masy), a następnie w niewielkim stopniu spadała i osiągała wartość około 2.8 U/mg świeżej masy. W przypadku osobników tolerancyjnych wzrost aktywności dysmutazy ponadtlenkowej miał miejsce również od 6 godziny po inokulacji, jednak już po 24 godzinach aktywność enzymu była większa niż u najmniej tolerancyjnych jesionów. Osobniki te

wykazywały ciągły wzrost aktywności enzymu w okresie 72 godzin po inokulacji. Maksymalna aktywność dysmutazy ponadtlenkowej wynosiła około 3.8 U/mg świeżej masy (Ryc. 19).



Ryc. 21. Zmiany aktywności dysmutazy ponadtlenkowej w pędach roślin szczepionych *Chalara fraxinea*, I, II, III - klasy tolerancji na infekcję.

9. Podsumowanie wyników

Realizacja zadań w ramach obecnego tematu badawczego w odniesieniu do jesionu odbywała się w ramach dwóch etapów. Etap pierwszy trwał od 2006 do 2009 roku i obejmował zadania dotyczące głównie typów symptomów, nasilenia ich występowania w drzewostanach będących w różnym wieku i rosnących na różnych siedliskach, składu gatunkowego grzybów obecnych w nekrotycznych tkankach, oraz wybranych aspektów dotyczących rozwoju stwierdzonych grzybów, łącznie z badaniami nad patogenicznością gatunku, któremu przypisano związek z procesem chorobowym. Etap drugi trwał od 2009 do 2012 roku i dotyczył głównie badań w zakresie istnienia genetycznej odporności jesionów na chorobę oraz obserwacji nad przebiegiem procesu chorobowego w uprawach jesionowych nowo założonych dla celów doświadczalnych. Prowadzono też dalsze wycinkowe prace dla uzyskiwania informacji o cyklu rozwojowym sprawcy choroby i uwarunkowaniach procesu chorobowego.

W okresie rozpoczynania badań w 2006 roku w ramach tego tematu stan wiedzy przedstawiał się następująco: a/ znany był problem zamierania jesionu w Polsce, b/ były nieliczne doniesienia o zamieraniu jesionu z innych krajów Europy: Litwy, Szwecji, Danii, Niemiec, c/ Kierownik tematu na podstawie badań własnych realizowanych w latach 2000 - 2005 opisał nowy gatunek grzyba,

który początkowo zaliczył do rodzaju *Chalara* (Kowalski 2001), a następnie do gatunku *Chalara fraxinea* (Kowalski 2006).

W okresie sprawozdawczym z badań w ramach tego tematu w 2012 roku stan wiedzy przedstawia się następująco: a/ zamieranie jesionu stwierdzone zostało w ponad 20 krajach Europy. W wielu krajach choroba jesionu zaliczana jest do najważniejszych chorób drzew liściastych, b/ po dwudziestu latach trwania choroby jesionu w rejonie kontynentalnej Europy, w 2012 roku jesiony zaczynają poważnie chorować na Wyspach Brytyjskich, gdzie jesion jest trzecim co do częstotliwości występowania gatunkiem drzew leśnych, czemu towarzyszy ogromne zaniepokojenie (posiedzenie sztabu kryzysowego, debaty parlamentarne, zainteresowanie stanem sytuacji w krajach, w których choroba występuje już kilkanaście lat), c/ w całej Europie gdzie zamiera jesion pojawia się grzyb *Chalara fraxinea* oraz jego stadium generatywne, d/ zainteresowanie problemem rozszerza się na kraje azjatyckie, skąd najprawdopodobniej został zawleczony sprawca zamierania jesionu, e/ uznając wagę problemu Unia Europejska, celem zintensyfikowania wymiany doświadczeń, w ostatnich latach pozytywnie zaopiniowała działania w ramach dwóch akcji COST.

W związku z takim rozwojem problemu zamierania jesionu w Europie i prowadzeniem intensywnych badań w wielu krajach, oprócz badań realizowanych w ramach obecnego tematu prowadzono inne szczegółowe badania, które między innymi wymagały współpracy międzynarodowej. Ustalenia wynikające z tych badań uwzględniono w obecnym sprawozdaniu. Dotyczą one wyników zwłaszcza w zakresie taksonomii sprawcy zamierania jesionu, których rozwiązanie wymagało porównań z rejonami Europy, gdzie jesiony jeszcze nie zamierają (np. południowa część Alp).

Przeprowadzone badania wskazują, że choroba, którą określa się mianem zamierania jesionu rozpoczyna się głównie na nadziemnych częściach drzew. W wyjątkowych okolicznościach może rozpoczynać się w obrębie górnej części systemu korzeniowego. Badania nad typami objawów chorobowych u jesionu wyniosłego prowadzono na terenie południowej Polski, zwłaszcza w Nadleśnictwie Andrychów, Gryfice, Kańczuga, Łosie, Mircze, Miechów, Radymno, Rymanów, Sieniawa, Stary Sącz, Staszów, Włoszczowa oraz, dla celów porównawczych, na terenie północno-zachodniej Polski, w Nadleśnictwie Rokita, Resko i Gryfice (RDLP Szczecin). W wybranych drzewostanach o różnym wieku dokonywano analizy symptomów chorobowych występujących u chorych, zamierających i martwych jesionów. W ocenie tej uwzględniano stan zdrowotny liści, gałęzi, pędów głównych, pni oraz korzeni. Uzyskane wyniki dały podstawę do wyróżnienia i dopracowania charakterystyki symptomów chorobowych, które w znacznym stopniu wykorzystano w realizacji następnych zadań, zwłaszcza do oceny nasilenia procesu chorobowego oraz analizy

składu gatunkowego i ilościowego mykobiota w obrębie tkanek roślinnych wykazujących zmiany chorobowe. U analizowanych jesionów stwierdzono następujące objawy chorobowe:

a) w obrębie aparatu asymilacyjnego - więdnięcie, przebarwienia i nekrozy lokalne lub całkowite liści oraz ich przedwczesny opad, prowadzący do przerzedzenia korony.

Do charakterystycznych symptomów porażenia liści jesionu przez grzyb *Chalara fraxinea* należy zaliczyć lokalne nekrozy zwłaszcza na nerwach głównych, prowadzące do nieregularnego przebarwienia tkanek.

b) w obrębie korony - zamieranie całych gałęzi lub ich szczytów, zamieranie wierzchołków, nekrozy lokalne zabliźnione i niezabliźnione oraz zrakowacenia na gałęziach. Objawy te wiązały się z nieregularnym ulistnieniem korony. Na stan taki wpływało również tworzenie pędów przybyszowych wzdłuż żywych nasadowych części gałęzi, zwłaszcza o większej średnicy.

c) w obrębie strzałek i pni - na pniach drzew starszych oraz na strzałkach drzew młodych występowały: nekrozy kory zabliźnione i niezabliźnione, raki drzewne połączone z zapadaniem kory oraz miejscową hipertrofią, podłużne lub tafelkowate spękania kory, wykruszanie kory prowadzące do odsłaniania drewna. Nekrozom towarzyszyły na ogół przebarwienia kory. W miejscach nekroz przebarwienia kory miały charakter jednolity lub smugowaty. Wycieki brunatnej substancji w miejscu nekroz i pęknięć kory, lub zrakowaceń pojawiały się stosunkowo rzadko. Do objawów wewnętrznych należały przebarwienia drewna w formie sektorów oraz przebarwienia w kształcie litery „T".

d) w obrębie korzeni - lokalne zabliźnione lub niezabliźnione nekrozy, przebarwienia drewna, nekrozy całych pojedynczych korzeni. Obserwowano przypadki wytwarzania korzeni zastępczych w przypadku nekrozy i zgnilizny części systemu korzeniowego. U niektórych badanych jesionów nekrozy brały początek w obrębie szyi korzeniowej i górnej części systemu korzeniowego, czemu towarzyszyło w tym obszarze szarobrunatne przebarwienie drewna.

Założenia metodyczne dotyczące analizy nasilenia występowania typów objawów chorobowych charakterystycznych dla procesu zamierania jesionu polegały na tym, iż w wybranych nadleśnictwach południowej Polski (Staszów, Łosie, Sieniawa, Radymno) badania przeprowadzano w drzewostanach, które były dobierane losowo na podstawie operatu urządzeniowego tak, by reprezentowały różny wiek i różne siedliska, a także w miarę możliwości inne czynniki, np. sposób odnowienia. Były to jednolite drzewostany jesionowe, lub takie, w których jesion stanowił domieszkę. Udział jesionu w lasach Polski jest nieznaczny, stąd na ogół nie było możliwym takie dobieranie drzewostanów, które zapewniły by dobrą porównywalność wyników w zakresie określonej cechy. W każdym drzewostanie, w jego środkowej części dokonywano analizy stanu zdrowotnego drzew (n = 25 do 100, rosnące obok siebie w kilku rzędach lub gniazdach),

wyróżniając drzewa żywe bez objawów chorobowych (drzewa "zdrowe"), drzewa żywe wykazujące symptomy chorobowe (drzewa "chore") oraz drzewa martwe. Dla dwóch ostatnich kategorii określano rodzaje symptomów chorobowych według przyjętego kodu symptomologiczno-etiologicznego, po czym je zestawiano i obliczano częstość występowania.

Analizie poddano ponad 3200 drzew w różnym wieku, rosnących w ponad 70 drzewostanach na różnych siedliskach, powstałych drogą odnowienia sztucznego, oraz w mniejszym stopniu odnowienia naturalnego. Szczegółowe wyniki zostały przedstawione w licznych zestawieniach tabelarycznych dołączonych do sprawozdania. Wynika z nich, że: a/ istnieje duże nasilenie procesu chorobowego jesionu w drzewostanach oraz stosunkowo duże zróżnicowanie w nasileniu procesów chorobowych między drzewostanami, b/ najbardziej porażane są drzewostany pierwszej klasy wieku, zwłaszcza w przedziale 5 do 20 lat, c/ niektóre typy symptomów chorobowych są szczególnie częste w określonych przedziałach wiekowych, np. pojaw wilków czy przerzedzenie korony jest bardziej charakterystyczne dla starszych drzewostanów, d/ jesion wykazuje objawy zamierania na wszystkich zajmowanych typach siedliskowych, e/ jesion wykazuje objawy zamierania niezależnie od pochodzenia, przy czym stan młodych odnowień naturalnych jest nierzadko lepszy niż odnowień sztucznych, f/ stan zdrowotny niektórych odnowień naturalnych ulega znacznemu pogorszeniu po przekroczeniu ok. piątego roku życia, g/ do najbardziej charakterystycznych objawów chorobowych we wstępnych etapach należy zaliczyć przede wszystkim różnego typu nekrozy kory na pniach i gałęziach. Nekrozy te powstawały na pniach z różnych stron świata, z pewnym zwiększeniem częstości od strony południowej lub północnej. W przypadku chorób grzybowych, zróżnicowanie miejsc powstawania nekroz może być wynikiem odmiennych warunków mikroklimatycznych na różnych stronach pni, zwłaszcza dotyczących temperatury i wilgotności, czynników decydujących w głównej mierze o możliwości kiełkowania zarodników.

Analizę objawów chorobowych i ich nasilenia prowadzono również w odnowieniach naturalnych w Nadleśnictwach: Rymanów, Resko, Rokita, Gryfice i w otulinie Ojcowskiego Parku Narodowego. U młodych jesionów stwierdzano: więdniecie liści, nekrozy szczytu pędu głównego oraz szczytów pędów bocznych, nekrozy lokalne na strzałkach i na pędach, nekrozy pojedynczych korzeni oraz nekrozę całkowitą osobników. Badania prowadzone w różnych okresach czasu pozwoliły na określenie następstwa symptomów chorobowych, a zatem wyróżnienie objawów chorobowych pierwotnych i wtórnych. Nekrozy lokalne na strzałkach najczęściej brały początek od nasad odgałęzień bocznych. Zamieranie szczytów pędów przeważnie brało początek kilkanaście centymetrów poniżej wierzchołka. Nekrozom towarzyszyło jasnobeżowe lub ciemnobrunatne, jednolite, względnie smugowate przebarwienie kory, nierzadko połączone z lokalnymi zapadnięciami i wzdłużnymi lub tafelkowatymi spękaniami kory odsłaniającymi drewno. Odsetek zamarłych jesionów był różny, wynosił od 2% do 80%. Stan zdrowotny odnowień ulegał niekiedy

szybkiej zmianie. Na przykład, w Nadl. Rokita w 2-4-letnim odnowieniu naturalnym jesionu w oddz. 70b w 2008 r. nie dostrzegano objawów zamierania. W 2011 r. stwierdzono, że tylko 33,3% nie wykazywało symptomów chorobowych, a 46,7% osobników już obumarło.

Analizę objawów chorobowych, a cześciowo także ich nasilenia prowadzono również w szkółkach leśnych. Analiza sadzonek była prowadzona początkowo w szkółce w Nadleśnictwie Włoszczowa i Niepołomice, a następnie w Nadleśnictwie Stary Sącz i Rokita, gdzie po uzyskaniu zgody zwierzchnich władz, na bardzo ograniczonej powierzchni kontynuowano hodowlę jesionu dla potrzeb badawczych. Objawy chorobowe u sadzonek w szkółkach leśnych były zbieżne z tymi, które obserwowano w odnowieniach naturalnych i sztucznych. W trakcie oceny sadzonek w szkółce w Nadl. Stary Sącz, w 2008 roku na początku okresu wegetacyjnego udział osobników martwych wynosił, zależnie od kwatery od 8 do 13%, a objawy chorobowe w postaci nekroz lokalnych i nekroz szczytów pędów wystąpiły u 31do 38% sadzonek.

Analiza stanu jesionu w szkółce w Nadl. Rokita w trakcie drugiego okresu wegetacyjnego wykazała brak makroskopowych symptomów zamierania pędów u 71,5% siewek. Objawy nekroz pędu głównego i/lub pędów bocznych obserwowano u 24,0% siewek oraz nekrozę całkowitą 4,5% siewek.

Dla określenia sprawców różnych typów symptomów chorobowych u jesionu prowadzono mikologiczną analizę tych organów drzew, które wykazywały objawy chorobowe. Część pobranego materiału przeznaczono do analizy mikologicznej na podstawie wytworzonych w naturze owocników. Część zaś, obejmującą zwłaszcza próbki bez wykształconych owocników przeznaczono do izolacji grzybni na pożywkę, po dezynfekcji powierzchniowej próbek. Z jednego pędu do izolacji wycinano najczęściej 6, sporadycznie 12 lub więcej fragmentów. Wyrastające kolonie odszczepiano i inkubowano w temperaturze 20^{o}C. Celem stwierdzenia możliwości zasiedlania żywych tkanek jesionu przez grzyby endofityczne, izolacje wykonywano także z tkanek jesionów nie wykazujących objawów chorobowych. Ogółem wykonano izolacje z ponad 10 tysięcy fragmentów i przeanalizowano owocniki na ponad 650 pędach.

Na ustalenie głównego nurtu badań w zakresie etiologii miał wpływ fakt, że tuż przed rozpoczęciem obecnych badań został opisany jako nowy gatunek o nazwie *Chalara fraxinea* T. Kowalski (Kowalski 2006). By uzyskać odpowiedź, czy grzyb ten występuje lokalnie na danym obszarze, czy jest szeroko rozprzestrzeniony, dokonywano izolacji grzybów z próbek pochodzących z 25 jednostek organizacyjnych lasów w różnych rejonach Polski. Badania wykazały, że grzyb *Chalara fraxinea* jest pospolity na jesionach w całej Polsce. Został on wykazany na wszystkich terenach, w których pobierano do badań jesiony z objawami zamierania. Ogółem grzyb *Ch. fraxinea* został wykazany w 52,7% pędów. Częstość izolacji *Ch. fraxinea* jest wielokrotnie większa, gdy pędy jesionu znajdują się w początkowym stadium obumierania. Grzyb *Ch. fraxinea* może

infekować drzewa we wszystkich klasach wieku. Jednak wielokrotnie częściej jest wykazywany w szkółkach i drzewostanach pierwszej klasy wieku. Cechuje go zdolność infekcji różnych organów roślinnych. Jego obecność wykazana została w korzeniach, pędach i liściach. Częstość infekcji poszczególnych organów wykazuje jednak duże zróżnicowanie. Najczęściej infekowane są nerwy liściowe oraz pędy główne i gałęzie boczne.

Na podstawie wytworzonych na strzałkach i gałęziach jesionów owocników stwierdzono ponad 40 gatunków grzybów. Mimo stosunkowo dużego zróżnicowania gatunkowego, tylko nieliczne cechują się dużą częstotliwością występowania. Często na obumarłych częściach strzałek lub gałęzi jesionów występowało tylko pięć gatunków: *Cytospora pruinosa, Botryosphaeria stevensii* (anam. *Diplodia mutila*), *Phomopsis scobina, Massaria* sp. i *Diplodia* sp. Nieco częściej stwierdzano także *Phomopsis controversa, Diaporthe* sp., *Phomopsis* sp., *Didymosphaeria acerina i Nectria galligena*. Część z tych gatunków częściej stwierdzano w powiązaniu z określonymi objawami chorobowymi. Grzyby z rodzaju *Phomopsis* owocnikowały głównie w obrębie lokalnych nekroz wokół nasad gałęzi. Grzyb *Cytospora pruinosa* wytwarzał pyknidy zarówno na szczytach pędów jak i na odcinkach pędów między węzłami. Grzyb *Nectria galligena* wytwarzał charakterystyczne czerwone otocznie w obrębie rakowatych ran, którym towarzyszyły hipertrofie tkanek. *Nectria galligena* stwierdzano nie tylko na młodych jesionach, ale także na pniach ponad 60-letnich jesionów w obrębie rozległych hipertrofii na pniach i grubych gałęziach. Godne podkreślenia jest, że w obrębie nekrotycznych tkanek stwierdzano także *Chalara fraxinea.* Wytwarzał on ciemno zabarwione utwory sklerenchymatyczne, a na nich fialidy ze skupieniami konidiów na szczycie fialid. Jak wynika z danych w tabeli 25 nie było to zjawisko powszechne.

Dla identyfikacji grzybów w tkankach we wczesnych stadiach zamierania, w obrębie których nie wytworzyły się owocniki grzybów, oraz z drewna, wykonywano izolacje na pożywkę agarowo-maltozową. Poprzez izolacje z chorych tkanek wyróżniono ponad 30 gatunków grzybów. Do częstych, poza *Chalara fraxinea,* należały także: *Alternaria alternata, Phomopsis scobina, Phomopsis* sp., *Cytospora pruinosa, Diplodia mutila* i *Fusarium* spp.

W obecnych badaniach poświęcono także uwagę czterem innym aspektom związanym z *Chalara fraxinea*: udziału *Ch. fraxinea* w powodowaniu chorób liści jesionów, rozwoju tego gatunku w obrębie chodników jeśniaka rdzawego oraz możliwości infekowania korzeni i możliwości endofitycznego trybu życia. Badania wskazują na minimalne możliwości przenoszenia grzyba *Ch. fraxinea* przez jeśniaka z drzew obumierających na żywe jesiony.

Korzenie jesionów infekowane były tylko sporadycznie przez *Chalara fraxinea*. Takie przypadki obserwowano dotychczas tylko u kilkuletnich sadzonek, zwłaszcza w szkółkach, Drewno korzeni zasiedlonych przez *Ch. fraxinea* wykazywało szarobrunatne przebarwienie.

Wykonane izolacje z nerwów liściowych będących w różnym stadium zaawansowania nekroz po uprzedniej dezynfekcji powierzchniowej tkanek potwierdziły możliwość częstych infekcji liści przez ten gatunek i powodowania nekroz. W trakcie realizowanych badań nie stwierdzono, by *Ch. fraxinea* występowała jako endofit w żywych korzeniach, pędach lub liściach.

Z przedstawionych wyżej analiz mikologicznych wynika, że w zamierających tkankach jesionów można stwierdzić obecność kilkudziesięciu gatunków grzybów. Są wśród nich gatunki zdolne do powodowania nekroz, zwłaszcza w przypadku osłabienia drzew, jak i gatunki saprotroficzne oraz endofityczne. Z dotychczasowych ustaleń wynika, że za głównego sprawcę choroby jesionu należy uznać grzyb *Chalara fraxinea.* Wskazują na to przeprowadzone w trakcie obecnych badań wyniki testów na patogeniczność, potwierdzone w ostatnim okresie także takimi testami w innych krajach Europy, w Szwecji i w Austrii. Poczynione w ostatnich latach badania (autorskie oraz prowadzone we współpracy) pozwoliły zidentyfikować stadium generatywne tego gatunku, istotne zwłaszcza z tego względu, że ono odgrywa decydującą rolę w rozprzestrzenianiu choroby. Na podstawie miseczek stwierdzonych na terenie Nadl. Miechów, stadium generatywne zostało zaliczone do gatunku *Hymenoscyphus albidus* (Robergere ex Desm.) W. Philips (= pucharek jesionowy), który znany jest w Europie od 150 lat. Nigdy w przeszłości grzyb ten nie był wiązany z chorobą jesionu. Dlatego zespół z ETH w Zurychu przeprowadził we współpracy z Katedrą Fitopatologii Leśnej w Krakowie, w ramach badań wykraczających poza ramy obecnego tematu badawczego dalsze studium nad taksonomią stadium generatywnego. Stało się to możliwe po zgromadzeniu kultur wyizolowanych z nekroz na strzałkach jesionów oraz z miseczek *Hymenoscyphus* z terenów, gdzie jesion zamiera oraz z terenów, gdzie jesion nie wykazuje objawów zamierania (takie obszary najbliżej można było zlokalizować w Alpach w Szwajcarii). Przeprowadzone badania porównawcze wykazały, że w obrębie występującej na jesionie populacji identyfikowanej dotychczas jako *Hymenoscyphus albidus* można wyróżnić dwie filogenetyczne podgrupy. W efekcie tych badań zaproponowano dwie oddzielne nazwy dla populacji reprezentujących obydwie podgrupy. Populacji z terenów, gdzie jesion zamiera nadano nową nazwę gatunkową *Hymenoscyphus pseudoalbidus* (Queloz i in. 2011). Stadium anamorficznym tego nowo wyróżnionego workowca jest opisany w 2006 roku grzyb *Ch. fraxinea.* Dla populacji występującej na jesionach bez objawów zamierania aktualna została nazwa *H. albidus s. str.* Według dotychczasowego stanu wiedzy uważa się, że *H. albidus* nie wykazuje właściwości patogenicznych. W sprawozdaniu podano cechy taksonomiczne *H. pseudoalbidus* na podstawie okazów zebranych w Polsce.

Na podstawie całościowych badań można ustalić, że cykl rozwojowy sprawcy zamierania jesionu przedstawia się następująco: miseczki wytwarzane są zasadniczo na ubiegłorocznych nerwach liściowych jesionu leżących na dnie drzewostanów, zasadniczo w okresie od początku lipca do

końca września. W okresie pojawu miseczek następuje wyrzut zarodników workowych i ich rozprzestrzenianie przez wiatr. Zarodniki te dokonują infekcji: a) pędów głównych i gałęzi, powodując lokalne nekrozy kory i miazgi, oraz b) liści w koronach drzew, zwłaszcza w obrębie ich nerwu głównego, powodując lokalne nekrozy i zamieranie fragmentu szczytowego powyżej nekrozy, co prowadzi nierzadko do przedwczesnego opadu liści. Na opadłych na dno drzewostanów liściach, w okresie jesieni zasiedlone fragmenty nerwów głównych czernieją, co jest wynikiem tworzenia sklerenchymatycznej grzybni. Z grzybni tej wyrastają liczne fialidy na których szczycie zbierają się w postaci kropli konidia stadium anamorficznego, *Ch. fraxinea*. W miejscach tych w okresie letnim następnego roku nastąpi wykształcanie się miseczek.

Badania we wszystkich latach od chwili znalezienia związku pomiędzy *Chalara fraxinea* a jej stadium teleomorficznym, prowadzone każdorazowo w okresie od końca czerwca do początku października przeprowadzone w drzewostanach jesionowych w różnych częściach Polski wykazały, że we wszystkich drzewostanach, niezależnie od wieku, na ubiegłorocznych nerwach liściowych jesionu występują miseczki *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, co wskazuje na ogromny rezerwuar materiału zakaźnego w obrębie ścioły w drzewostanach z udziałem jesionu.

Badania laboratoryjne wykazały, że stwierdzane w tkankach jesionu najczęstsze gatunki grzybów wzrastają najszybciej w temperaturze: *Chalara fraxinea* - 20^{o}C, ale niewiele wolniejszy wzrost następował w temperaturze 15^{o}C i 25^{o}C, *Phomopsis controversa* - 25^{o}C, C*ytospora* cf. *pruinosa* - 30^{o}C , *Fusarium lateritium* - 25^{o}C oraz *Diplodia mutila* - 25^{o}C, przy czym w temperaturze 35^{o}C kolonia zatraca melaninowy barwnik i pojawiają się białe strzępki, które jednak zachowują żywotność.

Przeprowadzono doświadczenia polegające na sztucznej inokulacji jesionów grzybem *Chalara fraxinea,* celem określenia właściwości patogenicznych tego gatunku. Dokonano inokulacji 60 jesionów w wieku 3 - 5 lat, o wysokości 1.1 do 3.2 m, z których dwanaście służyło jako kontrola. Wykorzystano dziesięć izolatów *Chalara fraxinea,* uzyskanych uprzednio z chorych jesionów w Nadl. Jędrzejów, Niepołomice, Miechów i Staszów. Inokulum umieszczano w nacięcie kory (8 mm dł) pędu wykonane sterylnym skalpelem, po czym miejsce takie owijano parafilmem. Podczas oceny określano długość całkowitą nekrozy, oraz jej rozmiar powyżej i poniżej miejsca inokulacji. Objawy chorobowe w postaci nekroz lokalnych lub zamarcia pędu wystąpiły u wszystkich inokulowanych egzemplarzy. Rodzaj symptomów zależał od czasu jaki upłynął od terminu inokulacji do oceny. Po upływie 2 - 3 miesięcy obumarło 29,6% pędów, po 12 miesiącach 76,2% pędów wykazywało takie symptomy. Długość obumarłych pędów wynosiła od 28 do 158 cm. Spośród 12 jesionów, które służyły jako kontrola brak było objawów nekroz, poza jednym przypadkiem, rany były w pełni zabliźnione. Spośród 48 inokulowanych jesionów, *Ch. fraxinea* została reizolowana z 41 osobników. Oprócz *Ch. fraxinea* najczęściej izolowano *Fusarium*

lateritium, Fusarium sp., *Phomopsis* spp. i *Diplodia mutila*. Są to gatunki szybko rosnące i mogły utrudniać wyrastanie *Ch. fraxinea* na pożywkę. Przeprowadzone doświadczenia potwierdziły patogeniczne właściwości *Ch. fraxinea* względem jesionu wyniosłego.

W związku z dużym nasileniem procesu zamierania jesionu, zwłaszcza w młodych drzewostanach i związanymi z tym dużymi stratami ekonomicznymi Lasy Państwowe zaleciły wstrzymanie hodowli jesionu w szkółkach i wprowadzanie tego gatunku do upraw. By uzyskać informacje w jakim stopniu należy się liczyć ze stratami w obecnej sytuacji, gdy proces chorobowy trwa w Polsce już od dwudziestu lat, postanowiono założyć uprawy doświadczalne celem obserwacji nad stanem zdrowotnym jesionu.

Badania fitopatologiczne prowadzone były na pięciu uprawach doświadczalnych nowo założonych po uzgodnieniach z DGLP i odpowiednimi RDLP. Są to: powierzchnia nr 1 i 2 - Nadleśnictwo Stary Sącz, powierzchnia 3 - Nadleśnictwo Limanowa, powierzchnia 4 i 5 - Nadleśnictwo Rokita.

Na powierzchniach 1 - 3 wysadzono wiosną 2008 r. sadzonki jesionu wyniosłego ze szkółki Kamieniec w Nadl. Stary Sącz. Na powierzchniach 4 - 5 wysadzono wiosną 2010 r. sadzonki jesionu wyniosłego wyhodowane do tego celu w szkółce w Nadl. Rokita. Do wysadzenia na powierzchniach przeznaczone zostały sadzonki nie wykazujące żadnych makroskopowych objawów chorobowych. Tempo całkowitego obumierania sadzonek po upływie jednego okresu wegetacyjnego nie było duże i wyniosło na jednej powierzchni maksymalnie 12,0%. Natomiast lokalnie dochodziło do częstego zamierania nadziemnej części przy żywym systemie korzeniowym, co skutkuje nierzadko wyrastaniem pędów odroślowych. Najbardziej zaznaczał się ten symptom po upływie jednego roku na powierzchni Nr 3 w Nadl. Limanowa.

W 2012 roku sadzonki jesionu na powierzchni Nr 1 do 3 były oceniane po pięciu okresach wegetacyjnych, zaś na powierzchniach Nr 4 i 5 po trzech okresach wegetacyjnych. Pomiędzy tymi powierzchniami istnieje zasadnicza różnica w stanie zdrowotnym sadzonek. W obrębie pierwszej grupy powierzchni, na terenie RDLP Kraków, jedynie 6,3 do 16,8% osobników nie wykazywało objawów chorobowych. Na powierzchniach w RDLP Szczecin było 36,2 do 57,2% takich osobników.

Grzyby w nekrotycznych tkankach sadzonek w uprawach doświadczalnych identyfikowano na podstawie owocników oraz na podstawie izolacji. Grzyby w tych uprawach nie różniły się od składu gatunkowego wykazywanego na jesionach w drzewostanach. Najczęściej izolowano grzyb *Ch. fraxinea*, a następnie: *Alternaria alternata, Botryosphaeria stevensii, Fusarium avenaceum, F. lateritium* i *Phomopsis* sp. 1. Owocniki na pędach najczęściej wytwarzały: *B. stevensii, Cytospora* sp. 1, *Massaria* sp. oraz *Phomopsis* sp. 1. Grzyb *B. stevensii* w zdecydowanej większości wytwarzał stadium anamorficzne, znane jako *Diplodia mutila*. Ten sam skład gatunkowy najczęstszych

gatunków stwierdzano w obrębie nekroz u sadzonek jesionu na kwaterach doświadczalnych w szkółce Nadleśnictwa Stary Sącz i Nadleśnictwa Rokita.

W trakcie przeprowadzonych analiz dla wybranych populacji zidentyfikowano kilka markerów molekularnych związanych z odpornością jesionu na zamieranie. Ich identyfikacja była możliwa dzięki zastosowaniu markerów RAPD i metody BSA (Bulked Segregant Analysis) często używanych dla poszukiwania markerów molekularnych u drzew leśnych, szczególnie w przypadku cech ilościowych warunkujących między innymi odporność na działanie niektórych patogenów. Potencjalna wada markerów RAPD polega na tym, że markery o tej samej długości i pozycji na żelu agarozowym mogą pochodzić z różnych lokus w genomie. Dlatego dla zwiększenia ich specyficzności opracowano tzw. markery SCAR (Sequence Characterized Amplified Region), a następnie startery pozwalające na szybką i pewną identyfikację odpornych lub charakteryzujących się zwiększoną odpornością osobników jesionu.

Badania przeprowadzono w trzech RDLP (Szczecin, Radom i Kraków) na powierzchniach z zamierającymi jesionami. Na każdej z nich wybrano osobniki zdrowe, nie wykazujące objawów choroby oraz osobniki w różnym stopniu porażone. Z osobników jesionu pobrano liście lub korę do wykonania analiz genetycznych. Z niektórych powierzchni (z Nadleśnictwa Rokita i Staszów) pobrano materiał do założenia powierzchni doświadczalnej w celu przeprowadzenia sztucznej inokulacji grzybem *Chalara fraxinea* i przygotowania materiału do testowania działania potencjalnych markerów.

Dla zapewnienia odpowiedniej ilości i jakości DNA do analiz przeprowadzono optymalizację metody jego ekstrakcji. Najlepszym sposobem izolacji DNA okazała się metoda oparta na protokole Khanuja i in. (1991) zmodyfikowana w ramach niniejszego projektu dla ekstrakcji DNA z liści i kory jesionu.

Poszukiwanie markerów molekularnych związanych z odpornością jesionu na zamieranie przeprowadzono z użyciem 720 starterów RAPD i RAMS. Monomorficzne prążki różnicujące odporne i wrażliwe jesiony stwierdzono dla 8 starterów. Markery wykazywały wysoką specyficzność dla danej populacji, ale nie dla całego gatunku. Wysoka skuteczność identyfikacji odpornych (lub wrażliwych) osobników jesionu została potwierdzone przez otrzymanie markerów dla osobników tolerujących infekcję wyselekcjonowanych w wyniku wcześniejszego przeprowadzenia na nich sztucznej infekcji przez *Chalara fraxinea*.

Markery wykazujące specyficzność dla określonych populacji zsekwencjonowano i opracowano specyficzne startery (tzw. startery SCAR) umożliwiające ich otrzymanie. Działanie markerów testowano dla populacji jesionu z Nadleśnictw: Rokita, Miechów i Stary Sącz. Skuteczność identyfikacji odpornych (lub wrażliwych) osobników jesionu wynosiła dla populacji z Nadl. Rokita 93%, natomiast dla populacji z Nadl. Miechów i Stary Sącz 100%. Błędna identyfikacja (obecność

markera dla przeciwnej grupy osobników) występowała maksymalnie dla 3.3 (Nadl. Miechów i Stary Sącz) do 6.6% (Nadl. Rokita) osobników.

Rośliny jesionu wykazały zróżnicowaną tolerancję na infekcję przez *Chalara fraxinea* wyrażoną długością nekroz na pędach powstałych w wyniku inokulacji patogenem. Wprowadzony wskaźnik tolerancji na infekcję był istotnie skorelowany z długością powstałych nekroz (średni współczynnik korelacji $r=0.72$, $P<0.001$)

Osobniki jesionu o różnym wskaźniku tolerancji na infekcję wykazywały różnice pod względem biochemicznej reakcji na obecność patogenu. Reakcja osobników jesionu na sztuczną inokulację patogenem była tym szybsza im bardziej tolerancyjne były osobniki jesionu. Stężenie reaktywnych form tlenu (nadtlenku wodoru i anionorodnika ponadtlenkowego) i aktywność enzymów katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej była tym większa im bardziej tolerancyjne na infekcję były osobniki jesionu. Bardziej odporne jesiony wykazywały szybszą syntezę i większą zawartość fenoli ogólnych i flawonoidów w stosunku do osobników bardziej wrażliwych na infekcję.

10. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań można wyprowadzić następujące wnioski :

1. W zdecydowanej większości drzewostanów na terenie Polski jesion wyniosły ulega procesowi chorobowemu o zróżnicowanym nasileniu. Daje się zauważyć, że:

- Chorobie ulegają jesiony we wszystkich przedziałach wiekowych, lecz nasilenie procesu chorobowego zaznacza się szczególnie w drzewostanach pierwszej klasy wieku
- Chorobie ulegają jesiony niezależnie od pochodzenia, jednak nasilenie niektórych symptomów chorobowych jest mniejsze w naturalnych odnowieniach jesionu niż w nasadzeniach sztucznych
- Chorobie ulegają jesiony rosnące na różnych siedliskach, przy czym nasilenie procesu i pojaw niektórych symptomów wykazuje pewne różnice w zależności od lokalnych warunków.

2. Do najczęstszych symptomów chorobowych towarzyszących zamieraniu jesionu należy zaliczyć: uwiąd lisci, nekrozy lokalne lub rozległe na pniach i gałęziach oraz liściach, zamieranie wierzchołków drzew, zamieranie gałęzi lub ich szczytów, przerzedzenie korony i wykształcanie wilków na pniach i grubych gałęziach. Symptomy te występują na jesionach w różnych rejonach Polski, choć obserwowane są różnice w częstości występowania niektórych z tych objawów. Symptomy te są w większości podobne do objawów obserwowanych w innych krajach Europy.

3. Zamieranie jesionu wyniosłego nie jest problemem lokalnym lecz ogólno europejskim, o bezprecedensowej skali w znanej nam historii rozwoju tego gatunku drzewa. Dzięki włożonemu wysiłkowi badawczemu rozpoznany został zasadniczy sprawca zamierania jesionu oraz jego zupełnie nietypowy cykl rozwojowy. Sprawcą okazał się grzyb *Chalara fraxinea* (teleomorfa: *Hymenoscyphus pseudoalbidus*). Świadczy o tym szerokie rozprzestrzenienie *Ch. fraxinea* w Polsce i w ponad 20 innych krajach Europy, w których zamiera jesion, duża częstotliwość występowania na chorych jesionach oraz wysoka patogeniczność, potwierdzona poprzez sztuczne inokulacje jesionów zarówno w Polsce jak i innych krajach Europy.

4. Do najbardziej istotnych elementów rozpoznanego cyklu rozwojowego *Chalara fraxinea/Hymenoscyphus pseudoalbidus*, jako sprawcy zamierania jesionu, należy zaliczyć następujące trzy stwierdzenia:

a/ Infekcji jesionów dokonują zarodniki workowe głównie w okresie od końca czerwca do końca września.

b/ Zasadniczy rezerwuar materiału zakaźnego stanowią miseczki wytwarzane na ubiegłorocznych nerwach liściowych jesionu w ściole.

c/ Panujące w Polsce temperatury w okresie lata są sprzyjające dla grzyba *Ch. fraxinea,* dla którego optimum wynosi 20 ^{o}C, ale wzrost jest stosunkowo dobry w zakresie 15-25 ^{o}C.

5. Do grzybów najczęściej występujących w obrębie nekrotycznych tkanek jesionów, mogących powiększać rozmiary nekroz u jesionów, osłabionych atakiem *Chalara fraxinea,* należy zaliczyć zwłaszcza: *Botryosphaeria stevensii, Cytospora pruinosa, Fusarium lateritium*, *Massaria* sp. i grzyby z rodzaju *Phomopsis.*Także dla tych gatunków w Polsce temperatura w okresie lata na ogół nie jest czynnikiem ograniczającym rozwój. Optimum dla wzrostu większości z nich wynosi 25 ^{o}C.

6. Obserwowane stosunkowo duże nasilenie procesu chorobowego jesionu w nowo założonych uprawach doświadczalnych jesionu nie daje podstaw do zalecania obecnie powrotu do hodowli jesionu w szkółkach i jego wprowadzania do upraw w skali, która miała miejsce przed pojawem procesu zamierania jesionu.

7. Obserwacje w nowo założonych uprawach doświadczalnych wskazują, że cięcie na „bezpieńki" pozwala na wyprowadzenie zdrowych pędów, co przedłuża okres życia sadzonki. Jest to jednak

sukces połowiczny, gdyż pędy takie są również często infekowane, co prowadzi do śmierci sadzonek.

8. Brak możliwości przeprowadzania skutecznych działań ochronnych zarówno w młodych jak i starszych drzewostanach wynika z faktu powszechnego występowania materiału zakaźnego sprawcy na opadłych zeszłorocznych nerwach liściowych jesionu, leżących na dnie drzewostanów. Wytworzone na tych nerwach w ściole zarodniki workowe dokonują w okresie lata infekcji nadziemnych części jesionów.

9. Niewątpliwie jedyną drogą do ograniczenia rozprzestrzeniania sprawcy choroby jesionu byłoby totalne wygrabianie i palenie opadłych liści jesionu. Jest to jednak działanie praktycznie możliwe w szkółkach i zadrzewieniach. Takie działania o charakterze lokalnym nie uchronią drzew od infekcji z sąsiednich terenów.

10. W szkółkach istnieje możliwość chemicznej ochrony sadzonek. Z biologii patogenu wynika, że warunkiem skutecznej ochrony byłoby pokrycie sadzonek fungicydem w okresie od końca czerwca do końca września. Jednak sadzonki jesionu wyprodukowane w szkółkach wysadzone w uprawy bez chemicznej ochrony będą chorowały i zamierały.

11. Uzyskane wyniki i obserwacje dają podstawy do tego, by zalecać wspieranie odnowień naturalnych jesionu. W niektórych nadleśnictwach wykazują one lepszy stan zdrowotny niż nasadzenia sztuczne. Odnowienia naturalne, nawet w przypadku dużego nasilenia choroby, stwarzają możliwość naturalnej selekcji i przetrwania osobników najmniej podatnych.
Należałoby rozważyć celowość wypracowania na poziomie nadleśnictw bardziej szczegółowych zasad wspierania odnowień naturalnych tego gatunku. Dodatkowym uzasadnieniem takich działań może być fakt, że na obecnym etapie obsiew pochodzi z jesionów, które przetrwały kilkunastoletni okres trwania procesu chorobowego jesionu w naszym kraju.

12. Drzewa z objawami zamierania nie stanowią bezpośrednio substratu dla wykształcania rezerwuarów materiału zakaźnego głównego sprawcy zamierania jesionu (*Chalara fraxinea/ Hymenoscyphus pseudoalbidus)*, tzn. na drzewach z lokalnymi nekrozami lub zamarłymi gałęziami nie wytwarzają się zarodniki, które mogły by zagrażać sąsiednim zdrowym drzewom. Na takich martwych tkankach mogą zarodnikować inne gatunki, głównie z grupy patogenów słabości (*Botryosphaeria stevensii, Cytospora pruinosa, Massaria sp.* i *Phomopsis* spp.), a system

korzeniowy osłabionych drzew może być atakowany przez *Armillaria* sp. Fakty te winno się uwzględniać przy wyznaczaniu osobników *Fraxinus excelsior* do wycinki.

13. Proces chorobowy jesionu powodowany przez *Chalara fraxinea/Hymenoscyphus pseudoalbidus*, doprowadził do całkowitego rozpadu wielu drzewostanów. Jednak są drzewostany, w których część populacji jesionu, w zakresie około 10 do 25 %, (a lokalnie o większym udziale) wykazuje objawy tolerancji, tzn. objawy nekroz są zlokalizowane, i nie pociągają za sobą znacznych strat w rozwoju drzewa, względnie objawy odporności, cechujące się brakiem pojawu symptomów chorobowych. Ta część populacji może dać podstawy do przetrwania gatunku, lecz nierzadko jest zbyt mała by zapewnić zachowanie stanu drzewostanu o strukturze istniejącej przed rozpoczęciem procesu chorobowego.

14. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że osobniki nie wykazujące objawów chorobowych („zdrowe") różnią się w danym drzewostanie od osobników zamierających cechami genetycznymi i biochemicznymi. Różnice te są możliwe do wykazania przy pomocy analiz laboratoryjnych. Wskazane jest stosowanie markerów SCAR jako narzędzia wspomagającego selekcję osobników jesionu:

- dla identyfikacji wrażliwych na zamieranie jesionów zalecane jest stosowanie dla analizowanych populacji następujących markerów SCAR: dla populacji z Nadleśnictwa Rokita: R_A02, dla populacji z Nadleśnictwa Stary Sącz: SS_G11, dla populacji z Nadleśnictwa Miechów: M_L08.
- dla identyfikacji odpornych lub o zwiększonej tolerancji na zamieranie jesionów zalecane jest stosowanie markerów SCAR: dla populacji z Nadleśnictwa Stary Sącz: SS_I13, dla populacji z Nadleśnictwa Miechów: M_L14.

Stwierdzenie obecności wymienionych markerów u danego osobnika umożliwia z wysokim prawdopodobieństwem identyfikację genotypów jesionu odpornych na zamieranie.
Jednym ze sposobów mogących przynieść w przyszłości zadawalający efekt może być wykorzystanie do hodowli i nowych nasadzeń populacji jesionów genetycznie bardziej odpornych.

15. Dalsze obserwacje winny wykazać, czy w drodze naturalnych procesów będzie dochodziło do wykształcania systemicznej odporności drzew infekowanych uprzednio szczepami grzyba *Chalara fraxinea* o mniejszej patogeniczności. Na podstawie obserwacji w okresie realizacji obecnych badań można wskazać jednostkowe przykłady drzewostanów, które potwierdzałyby taką reakcje drzew *Fraxinus excelsior.*

16. Dla zachowania najcenniejszych genotypów i populacji jesionu należy:

- wybrać najcenniejsze pod względem cech gospodarczych populacje jesionu
- w obrębie wybranych populacji przy zastosowaniu analiz fitopatologicznych, markerów molekularnych i analiz biochemicznych zidentyfikować najcenniejsze osobniki wykazujące tolerancję lub odporność na chorobę i na ich podstawie stworzyć bazę odpornych genotypów
- w oparciu o potomstwo zidentyfikowanych osobników założyć plantacje odpornych genotypów jesionu.

17. Liczne dane wskazują, że sprawca zamierania jesionu został zawleczony do Polski z innych rejonów świata (najprawdopodobniej z Azji). Należało by w tym kontekście przeanalizować skuteczność obowiązujących przepisów "kwarantannowych".

18. Mimo rozpoznania sprawcy choroby jesionu i jego cyklu rozwojowego, na obecnym etapie, poza zasygnalizowanymi powyżej aspektami, nie jest się w stanie zaproponować jednoznacznie skutecznych metod ochrony jesionu. Taka sytuacja przedstawiana jest we wszystkich krajach Europy, w których jesion wykazuje objawy zamierania.

11. Literatura

Ainsworth E.A., Gillespie K.M. 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. Nature Protocols 2: 875 – 877.

Brasier C.M. 1991. *Ophiostoma novo-ulmi* sp. nov., a causative agent of current Dutch elm disease pandemics. Mycopathologia 115: 151–161.

Carlson J.E., Tulsieram L.K., Glaubitz J.C., Luk V.W.K., Kauffeldt C., Rutledge R. 1991. Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. Theoretical and Applied Genetics 83: 194 – 200.

Coghlan A. 2012. Are Europe's ash trees finished? New Scientist. www.newscientist.com

Dobrowolska D., Hein S., Wagner S., Clark J., Skovsgaard J. P., 2011. A review of European ash (*Fraxinus excelsior* L.): implications for silviculture. Forestry 84: 133–148.

Drenkhan R. Hanso M. 2010. New host species for *Chalara fraxinea*. New Disease Reports 22: 16.

Gil W., Łukaszewicz J., Paluch R., Zachara T. 2006. Zamieranie jesionu – rozmiar problemu. Las Polski 5: 19.

Green M.J., Hill M.A.O. 1984. Chemistry of dioxygen. Methods in Enzymology 105: 3 – 22.

Grzywacz A. 1995.Ważniejsze choroby infekcyjne. [w:] Jesion wyniosły *Fraxinus excelsior* L. W. Bugała (red.). Wyd. Sorus, Poznań−Kórnik: 371−415.

Hiemstra J.A. 1995. Verticillium wilt of *Fraxinus excelsior*. Ph.D. Thesis, Wageningen Agricultural University, the Netherlands. 213 pp.

Ioos R., Kowalski T., Husson C., Holdenrieder O. 2009. Rapid *in planta* detection of *Chalara fraxinea* by a real-time PCR assay using a dual labelled probe. European Journal of Plant Pathology 125: 329–335.

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

Jaworski A. 2011. Hodowla lasu. Charakterystyka hodowlana drzew i krzewów leśnych. PWRiL. Warszawa.

Khanuja S.P.S., Shasany A.J.I.T., Darokar M.P., Kumar S. 1999. Rapid Isolation of DNA from Dry and Fresh Samples of Plants Producing Large Amounts of Secondary Metabolites and Essential Oils. Plant Molecular Biology Reporter 17**:** 1 – 7.

Kirisits T., Matlakova M., Mottinger-Kroupa S., Halmschlager E., Lakatos F. 2009. *Chalara fraxinea* associated with dieback on narrow-leafed ash (*Fraxinus angustifolia*). New Disease Reports 19.

Kowalski T. 2001. O zamieraniu jesionów. Trybuna Leśnika 4: 6−7.

Kowalski T. 2006. *Chalara fraxinea* sp. nov. associated with dieback of ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland. Forest Pathology 36, 264-270.

Kowalski T. 2009. Rozprzestrzenienie grzyba *Chalara fraxinea* w aspekcie procesu chorobowego jesionu w Polsce. Sylwan 10: 668−674.

Kowalski T., Bartnik C. 2010. Morphological variation in colonies of *Chalara fraxinea* isolated from ash (*Fraxinus excelsior* L.) stems with symptoms of dieback and effects of temperature on colony growth and structure. Acta Agrobotanica 63: 99–106.

Kraj W., Zarek M, Kowalski T. 2011. Genetic variability of *Chalara fraxinea*, dieback cause of European Ash (*Fraxinus excelsior* L.). Mycological Progress 11: 37-45.

McCord I.M., Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein. Journal of Biological Chemistry 224: 6049 – 6055.

Michelmore R.W., Paran I., Kesseli R.V. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomie regions by using segregating populations. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 88**:** 9828 – 9832.

Przybył K. 2002. Fungi associated with necrotic apical parts of *Fraxinus excelsior* shoots. Forest Pathology 32: 387–394.

Orendi G., Zimmermann P., Baar C., Zentgraf U. 2001. Loss of stress-induced expression of catalase3 during leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* is restricted to oxidative stress. Plant Science 161: 301 – 314.

Queloz V., Gruenig C.R., Berndt R., Kowalski T., Sieber T.N., Holdenrieder O. 2011. Cryptic speciation in *Hymenoscyphus albidus*. Forest Pathology 41: 133−142.

Schumacher J., Wulf A., Leonhard S. 2007. Erster Nachweis von *Chalara fraxinea* T. Kowalski sp. nov. in Deutschland – ein Verursacher neuartiger Schäden an Eschen. Nachrichtenblatt Deutscher Pflanzenschutzdienst. 59: 121–123.

Sierota Z., Stocka T., Małecka M., Duda-Kiełczewska B., Oszako T. 1993. Ocena występowania ważniejszych szkodników leśnych i chorób infekcyjnych w Polsce w roku 1992 oraz prognoza ich pojawu w roku 1993. *Instytut Badawczy Leśnictwa,* Warszawa.

Stocki J. 2001. Przyczyny zamierania drzew i drzewostanów jesionowych w Polsce. Głos Lasu 4: 17–19.

Sztuba – Solińska J. 2005. Systemy markerów molekularnych i ich zastosowanie w hodowli roślin. Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych 54: 227 – 239.

Thoirain B., Husson C., Marcais B. 2007. Risk factors for the *Phytophthora* induced decline of alder in northeastern France. Phytopathology 97: 99–105.

Thomsen I.M., Skovsgaard J.P. 2006. Ash dieback: climatic damage or fungal attack? Skoven 38: 408–411.

Timmermann V., Børja I., Hietala A. M., Kirisits T., Solheim H. 2011. Ash dieback: pathogen spread and diurnal patterns of ascospore dispersal, with special emphasis on Norway. Bulletin OEPP/EPPO 41: 14–20.

Zhishen J., Mengcheng T., Jianming W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chemistry 64: 555 – 559.