

**NEKATERE IZKUŠNJE PRI IZVAJANJU KONVENCIONALNE ODBIRE IN
ŽLAHTNENJA PRAVEGA KOSTANJA (*Castanea sativa* Mill.) NA
TOLERANTNOST PROTI OKUŽBAM Z GLIVO *Cryphonectria parasitica* (Murrill)
Barr**

Mario LEŠNIK¹, Avrelija CENCIC², Božidar KRAJNČIČ³

^{1, 2, 3}Fakulteta za kmetijstvo Maribor

IZVLEČEK

V prispevku so predstavljene nekatere izkušnje pri raziskavah povezanih s selekcijo in žlahtnjenjem pravega kostanja (*Castanea sativa* Mill.) na tolerantnost proti okužbam z glivo *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr. Delo na konvencionalnem žlahtnjenju je zaradi velike popularnosti biotehnoških pristopov (genetski inženiring) skoraj popolnoma zamrlo. Uporaba konvencionalnih metod je še naprej smiselna in potrebna, ker zgolj z biotehnoškimi metodami do sedaj še vedno niso uspeli pridobiti zanesljivo in trajno odpornih populacij kostanjev, ki bi poleg visoke stopnje tolerantnosti proti okužbam z omejenim številom virulentnih tipov glive, imeli tudi ustrezno visoko stopnjo prilagodljivosti na lokalne rastiščne razmere. Med stopnjo tolerantnosti na okužbe in prilagodljivostjo populacij pravih kostanjev na variabilne rastiščne razmere obstaja tesna povezava. Predstavljeni so rezultati petletne odbire rastlin za oblikovanje starševskega (parentalnega) materiala za začetek programa križanja. Podana je ocena primernosti eksperimentalne tehnike umetnega okuževanja rastlin s trosi in micelijem virulentnih tipov glive za ocenjevanje odpornostnega odziva kostanjevih dreves starih od enega do štirih let.

Ključne besede: pravi kostanj, *Castanea sativa*, kostanjev rak, *Cryphonectria parasitica*, selekcija, žlahtnjenje na tolerantnost, eksperimentalna tehnika

ABSTRACT

**EXPERIENCES WITH CONVENTIONAL SELECTION AND GENETIC
IMPROVEMENT OF TOLERANCE OF THE EUROPEAN CHESTNUT (*Castanea
sativa* Mill.) TO
INFECTIONS WITH *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr**

The article presents experiences that were obtained during research associated with selection and genetic improvement of the European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) tolerance to infections with *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr. The conventional breeding methods aimed at creating tolerant populations are no longer very popular because of prevailing biotechnological approach, especially genetic engineering. The conventional selection is still needed due to the fact that biotechnology applied alone cannot assure the creation of plant materials that, beside high level of durable tolerance to infection caused by a limited number of virulent types of the fungus, are also well adapted to highly variable local growing conditions. There is a close relationship between the tolerance level of chestnut plants to the fungal infection and disease development, and the level of adaptability to the existing growing conditions. A five year practical work associated with the selection of tolerant genotypes was focused on creating parental material for genetic recombination. The work included critical evaluation of suitability of infection methodology (infections with fungal spores and mycelium) for quantification of tolerance response of young chestnut plants.

Key words: Chestnut blight, *Cryphonectria parasitica*, chestnut, *Castanea sativa*, conventional selection, genetic improvement of tolerance to disease, experimental techniques

¹izr. prof. dr. agr. zn., Vrbanska cesta 30, SI-2000 Maribor

²izr. prof. dr., Vrbanska cesta 30, SI-2000 Maribor

³redni prof. dr., Vrbanska cesta 30, SI-2000 Maribor

1. UVOD

Bolezen kostanjev rak, ki jo na pravem kostanju (*Castanea sativa* Mill.) povzroča gliva *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr je splošno razširjena v naših gozdovih. Tako kot v drugih državah smo tudi pri nas zaskrbljeni zaradi množičnega propadanja dreves, ki je ponekod že doseglo tolikšen obseg, da se sestoji po naravni poti ne uspejo več sproti obnavljati.

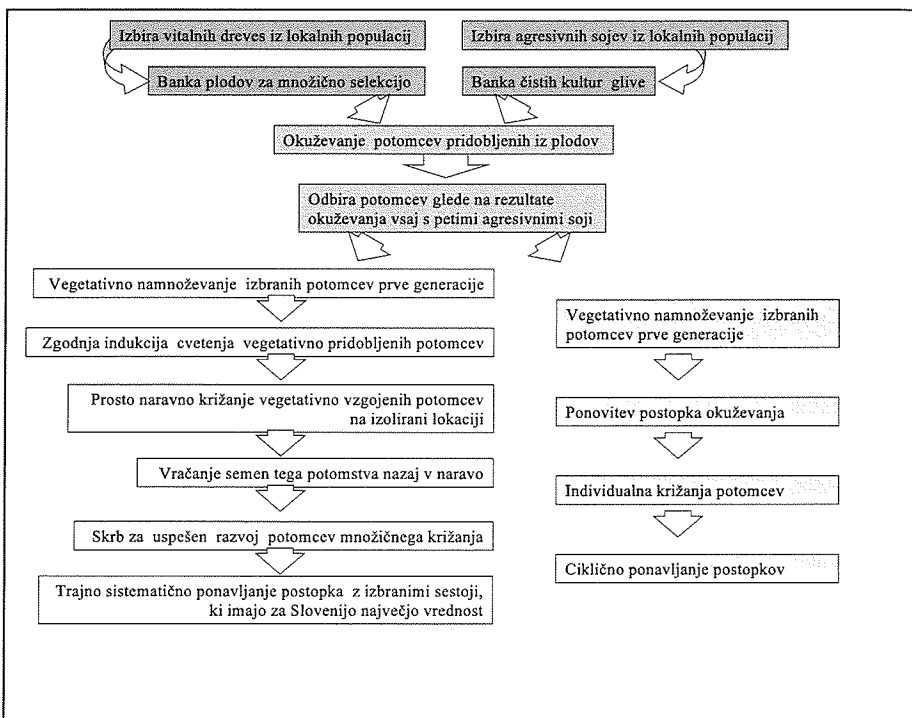
V zadnjih 50 letih so v Evropi in v ZDA začeli z izvajanjem številnih obsežnih raziskovalnih programov za reševanje problematike kostanjevega raka in za selekcijo odpornih rastlin. Pogosto se je večletno delo končalo z manjšim uspehom, kot je bilo pričakovano (npr. 30 letni švicarski program od leta 1951 do 1981; Bazzigher, 1981; Bazzigher in Miller, 1982; Roane *et al.*, 1986). Pokazalo se je, da s klasičnimi metodami odbire in žlahtnjenja skorajda ne moremo priti do populacij rastlin, ki bi imele zadosten in trajen odpornostni potencial. Seleksijski cikel je bistveno predolg, glede na hitrost genetskega rekombiniranja patogene glive. Pogosto izvajajo križanja z azijskimi vrstami kostanjev, čemur sledi veliko število povratnih križanj za izboljšanje neželenih fenotipskih lastnosti azijskih staršev. Hibridni potomci imajo pogosto manj uporabne gospodarske lastnosti in slabše prenašajo zimo. Dokaj velika ovira pri delu sta razmeroma počasen obrat potomstva (pozen vstop v rodnost) in nejasne povezave med fiziološkimi oziroma morfološkimi lastnostmi kostanjev in odpornostnim potencialom. Tako so mnogi mislili, da je moč odpornost korelirati s kemično sestavo lubja (npr. z vsebnostjo taninov). Do sedaj te povezave še niso zanesljivo potrdili (Anagnostakis, 1992). Prvo oviro so znanstveniki že delno premostili s preiščeno uporabo hormonov in kombinacijami hranil ter z razmnoževanjem v tkivnih kulturah, druga pa še vedno ostaja, kljub precejšnim uspehom pri določevanju regij genoma s potencialnimi geni za odpornost (Bernatzky in Mulcahy, 1992; Kubisiak *et al.*, 1997; Schafleitner in Wilhelm, 2002). Velik napredek je bilo spoznanje o hipovirulentnih sevih glive, ki so okuženi z hipovirusi (virusi brez proteinskega plašča iz družine Hypoviridae) ali pa vsebujejo nevirusne, za normalen razvoj glive, moteče fragmente RNK (Bissegger *et al.*, 1997; Peever *et al.*, 1997; Sandra *et al.*, 1998; Robin *et al.*, 2000; Hillman in Suzuki, 2004; Allen in Nuss, 2004). Ti sevi ne povzročajo tako uničujoče oblike bolezni, kot virulentni sevi. S hipovirulentnimi sevi okuženo drevje se uspe bolj ali manj sproti obnavljati, odprte rakaste rane se pri njih ne razvijejo (Hebard *et al.*, 1984). Dodatno je drevje okuženo z hipovirulentnimi sevi precej manj dovzetno za propadanje po okužbi z agresivnimi (virulentnimi) sevi. Pri razvoju v istem tkivu med virulentnimi in hipovirulentnimi sevi prihaja do antagonizma, pri paraseksualnem razmnoževanju pa hipovirulentni sevi z virusi okužijo virulentne, kar ovira normalen razvoj zadnjih. V ZDA so ustvarili genetsko modificirane hipovirulentne seve glive in jih sprostili v naravne sestoje. Tam je pohod genetskega inženiringa opazen tudi pri izboljševanju gozdnega drevja (Adams *et al.*, 2002). Takšni pristopi z uporabo genetskega inženiringa za Evropejce za zdaj še niso sprejemljivi. Hipovirulenca je še vedno ena od vodilnih tem raziskovalcev saj v zvezi z njo letno objavijo več deset člankov, kar kaže na velik potencial te metode. Prav tako je videti, da so evropske države opustile programe klasične selekcije kostanjev na odpornost proti *C. parasitica*. Tudi v naših gozdovih praktično izrabljamo fenomen hipovirulence in s selektivnim sekanjem dreves okuženih z virulentnimi soji skušamo povečati delež dreves, ki so okužena z hipovirulentnimi sevi. S tem skušamo vplivati na populacijsko dinamiko obeh gliv. Opravljenih je bilo tudi nekaj domačih raziskav (Jurc, 1997). Ocene nekaterih gozdarskih strokovnjakov kažejo, da ta cenen sistem dela daje pozitivne rezultate in, da se popolnega izumrtja kostanja pri nas ni bati. 50 do 60 let od začetka širjenja glive je verjetno še prekratek čas, da bi se v naravi vzpostavilo stabilno ravnotežje med patogenom in gostiteljem. Pri nas še ne razpolagamo s popolno banko podatkov o številu hipovirulentnih sevov in o možnostih za paraseksualno križanje preko anastomoznih mostov med njimi samimi in virulentnimi sevi. Opazovanja v naravi kažejo, da so hipovirulentni sevi pri nas že bolj ali manj razširjeni po vsem arealu pojavljanja pravega kostanja in njegove bolezni. Navadno raziskovanje tako kompleksnih bolezni dreves, kot je kostanjev rak, zahteva veliko

denarja, ki ga v našem okolju ni na voljo, kljub vesplošnem poudarjanju o pomenu reševanja problematike kostanjevega raka. Vprašanje je, ali je s skromnimi sredstvi sploh mogoče kaj narediti, posebej ob pogledu na izkušnje veliko bogatejših, ki prav tako niso ustvarili zares tolerantnih populacij dreves. Gotovo nas v tej zagati s fenomenom hipovirulence narava rešuje kar sama. Glede na to, da v nekaterih okoljih hipovirulentni sevi ne morejo v kratkem času prevladati nad virulentnimi (primer; Milgroom in Cortesi, 2004), ker imajo ti obrambne mehanizme pred vnosom oslabitvenega virusnega RNK fragmenta (Robin *et al.*, 2000; Bissegger *et al.*, 1997), razmislek o pomoči naravi vseeno ni odveč.

V tem prispevku so predstavljeni nekateri rezultati sorazmerno skromne domače raziskave o možnostih preproste množične selekcije za ohranjanje genskega rezervoarja in potomstva nekaterih dreves, ki vizualno kažejo veliko življenjsko moč (vigor) in tolerantnost na okužbe z glivo.

2. MATERIAL IN METODE DELA

Diagram 1: Predlog za izvajanja množične selekcije (levo) in individualne selekcije (desno) pravega kostanja za pridobitev populacij potomcev tolerantnih na okužbe z glivo *Cryphonectria parasitica*.



2.1 Preučevana populacija kostonjev in glive

Za ocenjevanje stopnje tolerantnosti pravega kostonja (*Castanea sativa*) proti okužbam z glivo *Cryphonectria parasitica* smo tri leta izvajali umetne okužbe vejic sadik kostonjev s sporami in micelijem agresivnih sevov glive. Sadike so bile ob okuževanju stare tri (2001), štiri (2002) ali pet let (2003). Delo v vseh treh letih raziskovanja je potekalo na enak način. V gozdnih sestojih na Pohorju, na Kozjaku in v Halozah smo nabrali plodove kostonjevih dreves, ki so bila zdrava in so imela zarasle rane od okužb z glivo *C. parasitica*. V tem prispevku so predstavljeni rezultati poskusov na 200 drevesih gojenih v raziskovalni drevesnici na polju v botaničnem vrtu Fakultete za kmetijstvo Univerze v Mariboru.

V enakih gozdnih sestojih smo poiskali tudi popolnoma propadajoča drevesa okužena z agresivnimi (virulentnimi) sevi glive in iz njih izolirali micelij. Ocena, da gre za virulentne seve je temeljila na tem, da so drevesa popolnoma propadla in, da je imel micelij v čisti kulturi značilno oranžno barvo, med tem, ko hipovirulentni sevi glive v čisti kulturi navadno ne oblikujejo izrazitih pigmentov in je micelij rumenkast, belkast ali belkasto sivkast (Roane *et al.*, 1986). Micelij smo izolirali na običajen način iz vej, ki smo jih nekaj časa pustili s spodnjim delom namočene v vodi v vlažni komori. Pred odvzemom micelija smo veje površinsko sterilizirali z uporabo 3 % natrijevega hipoklorita (1-2 minuti). Nato smo na coni prehoda rakaste rane v zdravo lubje naredili rezno ploskev, da je bil viden kambij prerasel z micelijem, ki smo ga s skalpelom prenesli na običajen krompirjev dekstrozni agar (PDA; proizvajalec DIFCO). Po večkratnem precepljanju smo dobili čisto kulturo glive, ki smo jo gojili pri sobni temperaturi in zmerno visoki vlagi v petrijevkah v steklenih posodah.

2.2 Sistem okuževanja in ocenjevanja odpornostnega odziva dreves

Odločili smo se za sistem okuževanja v rane, ki smo jih povzročili z injekcijsko iglo v mesecu maju. V rane smo vstavili košček micelija (z agarjem vred) ali pa vbrizgali suspenzijo spor glive (mešanica piknospor in nekaj askospor). Želeli smo, da je rana pri obeh sistemih okuževanja enaka. V posameznem letu smo pri vseh drevesih uporabili samo en izolat glive. Izmed večjega števila izolatov smo se odločili za tri. V letu 2001 smo uporabili izolat Jelovice 3/2001 v letu 2002 izolat Slape 5/2002 in v letu 2003 izolat Slape 5a/2002. Za okuževanje smo izbirali vejice dolge 60 do 80 cm s premerom med 1 in 1,5 cm. Okužbo smo izvedli vsaj 30 cm stran od debla. Da bi preprečili vdor glive v centralno deblo smo po ocenjevanju okužene vejice odrezali tik ob deblu in rano premazali s cepilno smolo.

Pri postopku okuževanja s sporami (postopek A) smo pod lubje vej zarinili injekcijsko iglo in vbrizgali približno 1-2 ml suspenzije spor glive. Suspenzijo spor smo dobili tako, da smo 4 do 6 tednov star micelij glive v gojišču prelili z destilirano vodo in petrijevko potresli. V posamezno petrijevko smo nalili 30 ml destilirane vode. Potem smo suspenzijo vsrkali v injekcijo in ji dodali še 30 ml vode. Pri vseh pripravljenih petrijevkah smo ponovili enak postopek in nato tekočino združili v eno posodo in vse skupaj premešali, tako da so bila vsa drevesa inokulirana s suspenzijo iz iste posode. Preden smo suspenzijo iztisnili iz injekcijske igle smo vbodno mesto ovili z mikropor trakom (Micropore trak - Tosama št. 1535) tako, da je ob vbodnem mestu nastal žep, v katerem se je zadržala izbrizgana suspenzija. Potem smo mikropor v zgornjem delu previdno stisnili ob lubje, da je nastal ob vbodni rani balon poln suspenzije. Tako smo ustvarili ugodne razmere za kalitev spor, sicer bi se rana takoj po vbrizgavanju izsušila in spore morda ne bi kalile. V suspenziji spor so prevladovala enocelične piknospore (vsaj 500 spor na 1 ml).

Postopek okuževanja z micelijem (postopek B) smo izvedli tako, da smo najprej z injekcijsko iglo naredili enako rano kot pri vbrizgavanju spor (2 mm x 3,5 mm), nato pa smo poškodovano lubje malo privzdignili in pod njega vstavili 2 x 2 mm velik kos micelija z gojiščem vred. Nato smo micelij stisnili v rano z lubom, ki je štrlel od rane in rano ovili z mikropor trakom. Mikropor trak varuje rano pred hitro izsušitvijo in pred ptiči, ki zelo radi

jedo gojišče glive. Spore in micelij so izvirale iz istega izolata glive zato je primerjava med stopnjo tolerantnosti dreves proti okužbam s sporami ali okužbam z micelijem možna. Oceno razvoja glive na mestih okužbe smo opravili dva in pol meseca od datuma okuževanja. Običajne metode dela za ocenjevanje odpornostnega potenciala (Griffin *et al.*, 1983) smo nekoliko modificirali in poenostavili. Merjenje površine tkiva – lubja, poškodovanega od glive, po uspešni okužbi smo izvedli z uporabo ravnila s katerim smo izmerili vzdolžni premer od glive spremenjenega tkiva. Imeli smo namen izračunavati površino rakastih ran s pomočjo enačbe za ploščino elipse. Ker je gliva zelo pogosto prerasla lubje okrog celotnega obsega vejice, prečnih premerov nismo merili in prav tako nismo izračunavali površine rane. Za primerjave smo uporabili le podatek o vzdolžnem premeru. Nekateri raziskovalci odpornostni potencial kvantificirajo z hitrostjo povečevanja rakave rane v času, ne pa s končno velikostjo rane po določenem času (Anagnostakis, 1992). Tudi takšen pristop ne omogoča popolne kvantifikacije odpornostnega potenciala, ker zanesljive povezave med cono invadirano z micelijem in cono, ki kaže spremembe na lubju ni. Nekateri raziskovalci uporabljajo tudi drugačne, modificirane »*in vitro*« metode meritve rasti micelija na kosih vej ali neposredno na lubju (Rodríguez in Colinas, 1999; Lee *et al.*, 1992), ki pa se nam niso zdele primerne.

Osnovni kriteriji za dajanje ocen o tolerantnosti na okužbe so bili: velikost rakaste rane – pege, oblikovanje obrambnih kalusnih tkiv, oblikovanje delnih ali popolnih zaraslin na mestu okužbe in stopnja vitalnosti – propadlosti napadenih tkiv. Prikaz različnega obsega napadenih tkiv pri različno občutljivih drevesih je prikazan v preglednici 1. V primerih, ko okužba ni bila jasno vidna smo vejice odrezali in jih s spodnjim koncev namočili v vodo ter dali za tri tedne v vlažno komoro. Tako smo pospešili razvoj morebitnega latentnega micelija. Po tem času smo naredili prereze lubja in skušali najti micelij. Če micelija nismo našli smo šteli, da okužba ni uspela.

Oceno "zelo občutljivo drevo" smo uporabili pri drevesih, kjer je rakasta pega po dveh mesecih dosegla več kot 35 mm vzdolžnega premera in kjer se je vejica nad okuženim mestom začela sušiti, ker je gliva uničila vsa prevajalna tkiva okrog celotnega obsega vejice.

Oceno "občutljivo drevo" smo uporabili pri drevesih, kjer so nastale rane – pege s vzdolžnim premerom 20 do 35 mm, vejica nad okuženim mestom pa se ni začela sušiti. Pri drevesih ocenjenih z oceno "občutljivo drevo" v središču pege ali rane nismo opazili obrambnih kalusnih tkiv, temveč popolnoma mrtva tkiva lubja, ki je odstopilo od lesa. Oceno "srednje občutljivo drevo" smo uporabili pri drevesih, kjer so rakaste rane – pege dosegale vzdolžni premer 10 do 20 mm in gliva ni uničila vseh tkiv okrog celotnega obsega veje. V središču okužbe so še bili vidni posamezni otočki živih tkiv lubja in obrambne kalusne plasti. Oceno "malo občutljivo drevo" smo uporabili pri drevesih, kjer so rakaste rane – pege dosegale vzdolžni premer 5 do 10 mm in gliva ni uničila vseh tkiv okrog celotnega obsega veje. V središču okužbe je bili viden obrambni kalus in zarasline rane. Ocene "malo občutljivo drevo" v primerih, ko ni bilo mogoče opaziti razvoja glive nismo dali, ker v takšnem primeru nismo vedeli ali gliva dejansko ni uspela invadirati tkiva ali pa je šlo za slabo opravljen postopek okužbe.

Ocenjevanje pri okužbah s sporami in z micelijem je potekalo na enak način, le da je bil kriterij premer rane pri ocenjevanju okužb s sporami nekoliko drugačen. Pri razvrščanju v posamezni odpornostni razred smo pri okužbah s sporami upoštevali za 5 do 10 mm ožje premere rakastih ran (preglednica 1). Po okužbah s sporami se rana ob vdornem mestu, v začetnem obdobju povečuje značilno bolj počasi, zato je navadno neprimerno manjša, kot v primeru okužbe z micelijem. Če bi upoštevali popolnoma enak kriterij, bi bilo videti, da so drevesa pri okužbah s sporami bistveno bolj odporna.

Preglednica 1: Obrazložitev ocen za odpornostni odziv okuženih rastlin na podlagi vzdolžnega premera rakavih sprememb na vejicah

Table 1: Description of chestnut tolerance evaluation marks according to the longitudinal diameter of bark necroses developed at the point of artificial infection with spores or mycelium

Ocena občutljivosti: Ocena 2,5 mesca od okužbe: Assessment of susceptibility: Evaluation 2.5 months after infection:		Vzdolžni premer od raka spremenjenega lubja: Longitudinal diameter of bark necroses:	
		Okuženo s sporami: Infection by spores:	Okuženo z micelijem: Infection by mycelium:
Zelo občutljivo drevo Highly susceptible tree	ZOB	> 35 mm	> 25 mm
Občutljivo drevo Susceptible tree	OB	20 – 30 mm	10 – 20 mm
Srednje občutljivo drevo Moderately susceptible tree	SROB	10 – 20 mm	5 – 10 mm
Malo občutljivo drevo Less susceptible tree	MOB	5 – 10 mm	2 – 5 mm
Okužba ni uspela Infection did not occur	/	0 mm	0 mm
Potencialno tolerantno drevo Potentially tolerant tree	Če okužba ni uspela ne s sporami ne z micelijem. Infection was not realised neither by infection with spore, neither by mycelium.		

3. REZULTATI IN RAZPRAVA

V preglednici 2 je prikazanih nekaj primerov rezultatov ocenjevanja odziva mladih kostanjev na okužbe z micelijem in s sporami glive povzročiteljice kostanjevega raka. Podatki za vseh 200 dreves niso prikazani, ker bi zavzeli preveč prostora. Vidna je velika variabilnost rezultatov v času. Nekatera drevesa so v vseh treh letih preizkušanja odzvala enako (npr. drevo št. 40, 45, 181), pri drugih smo dobili spremenljive rezultate. Pri nekaterih se je stopnja tolerantnosti zmanjšala (npr. drevo št. 61), pri nekaterih se je povečala (npr. št. 107). Upoštevati je potrebno, da smo v posameznih letih uporabili različne izolate glive in da so bila drevesa ob okuževanju različno stara. Naredili smo tudi nekaj ponovnih okužb z izolatom vzdrževanim leto dni v čisti kulturi, vendar je ostal odziv dreves na iste izolate podoben, ne pa identičen, kar kaže na zmerno stabilnost virulentnosti izolata.

Vreme lahko ima velik vpliv na razvoja rakastih ran in micelija glive v kambiju (Anagnostakis in Aylor 1984; Anagnostakis, 1992). Pri analizi rezultatov je potrebno vedno upoštevati učinek posamezne rastne dobe in njene specifičnosti. Tudi drugi raziskovalci so ugotovili, da lahko posamezna rastna doba zelo vpliva na izražanje znakov okužb (Guerin in Robin, C. 2003).

Preglednica 2: Primerjave med ocenami stopnje tolerantnosti nekaterih kostanjevih dreves na okužbe z glivo *C. parasitica* med ocenjevanji v letu 2001, 2002 in 2003

Table 2: Comparison of evaluations of chestnut tree tolerance to the infection with *C. parasitica* between years 2001, 2002 and 2003 for some trees

Št. drevesa: No. of tree	TIP OKUŽBE: Type of infection:	Povprečni vzdolžni premer rakaste pege v letu 2003: Longitudinal diameter of bark necroses in 2003:	Ocena stopnje odpornosti drevesa: Chestnut tolerance evaluation marks:		
			Leto 2001	Leto 2002	Leto 2003
40	A - spore	20 mm - okužba je uspela	ZOB	ZOB	ZOB
	B - micelij	90 mm - okužba je uspela	ZOB	ZOB	ZOB
45	A - spore	20 mm - okužba je uspela	ZOB	ZOB	ZOB
	B - micelij	70 mm - okužba je uspela	ZOB	ZOB	ZOB
61	A - spore	20 mm - okužba je uspela	SROB	ZOB	ZOB
	B - micelij	70 mm - okužba je uspela	SROB	ZOB	ZOB
76	A - spore	10 mm - okužba je uspela	ZOB	OB	OB
	B - micelij	80 mm - okužba je uspela	ZOB	OB	ZOB
107	A - spore	10 mm - okužba je uspela	ZOB	ZOB	MOB
	B - micelij	25 mm - okužba je uspela	ZOB	ZOB	OB
137	A - spore	10 mm - okužba je uspela	NO	ZOB	MOB
	B - micelij	20 mm - okužba je uspela	NO	ZOB	SROB
138	A - spore	10 mm - okužba je uspela	/ ali PO	MOB	MOB
	B - micelij	20 mm - okužba je uspela	SROB	SROB	SROB
140	A - spore	13 mm - okužba je uspela	NO	ZOB	SROB
	B - micelij	20 mm - okužba je uspela	NO	ZOB	SROB
141	A - spore	3 mm - okužba je uspela	NO	OB	MOB
	B - micelij	18 mm - okužba je uspela	NO	ZOB	SROB
181	A - spore	10 mm - okužba je uspela	NO	MOB	MOB
	B - micelij	12 mm - okužba je uspela	NO	MOB	MOB
185	A - spore	10 mm - okužba je uspela	NO	MOB	MOB
	B - micelij	0 mm - okužba ni uspela	NO	/ ali PO	/ ali PO

Dodatno so se vremenske razmere med rastno dobo od obdobja okuževanja, do ocenjevanja v jeseni iz leta v leto spreminjale. Leto 2001 je bilo padavinsko in temperaturno povprečno, med tem, ko sta bili leti 2002 in 2003 topli in sušni. V letu 2002 smo imeli v obdobju okuževanja veliko padavin, pozneje v juliju in v avgustu pa je bilo precej sušno.

Vidne so tudi razlike med rezultati okuževanja s sporami in z micelijem. Pri okužbah s sporami je razvoj glive bistveno počasnejši, tudi uspeh okužbe je bistveno manjši (preglednica 3). Tudi razlike med leti so pri okužbah s sporami večje, kot pri okužbah z micelijem. Leto 2003 je bilo izrazito sušno. Razmere za kalitev spor so bile slabe, čeprav smo okuževanje izvedli tik pred dežjem. Uspeh okuževanja s sporami (60,5 %) je bil v letu 2003 bistveno slabši, kot v letu 2002 (84 %).

Prikaz uspeha okuževanja in distribucije ocen za celotno poskusno obdobje 2001-2003 je prikazan v preglednici 3. Rezultati dobljeni v posameznih letih se precej razlikujejo, prav tako so pri okuževanju s sporami drugačni, kot rezultati dobljeni z inokulacijo micelija. V letu

2001 (tri leta stara drevesa) je največji delež okuženih dreves dobil oceno zelo občutljivo drevo (ZOB), kar smo pričakovali. Delež dreves z oceno ZOB pri okužbah s sporami (65,4%) je bil večji, kot pri okužbah z micelijem (43,4%). Nasproten rezultat smo dosegli glede deleža srednje občutljivih dreves (26,9 % pri okužbah s sporami in 50% pri okužbah z micelijem). Ocene malo občutljivo drevo nismo dali nobenemu testiranemu drevesu. V letu 2002 je bila distribucija ocen drugačna. Prav tako je največji delež dreves dobil oceno ZOB (pri okužbah s sporami 54,4 % in pri okužbah z micelijem 67,9 %). Delež dreves z oceno srednje občutljivo drevo (SROB) je bil manjši. Precejšen delež dreves je dobil oceno manj občutljivo drevo. Pri teh, gliva v dveh mesecih od okuževanja ni uspela poškodovati prevajalnih tkiv do takšne stopnje, da bi se okužene vejice začele sušiti in opazno je bilo delno preraščanje rane s kalusom. Rezultati iz leta 2003 so se delno razlikovali od tistih iz leta 2002. Pri okužbah z micelijem smo imeli skoraj enak delež dreves, ki so dobila oceno ZOB. Pri okužbah s sporami je bil ta delež bistveno nižji, kar je verjetno posledica vremenskih razmer. Zaradi tega smo imeli pri okužbah s sporami veliko dreves, ki so dobila oceno manj občutljivo drevo (26 %).

Preglednica 3: Podatki o deležu uspešnih okužb in ocene stopnje tolerantnosti kostanjevih dreves na okužbo z glivo *C. parasitica* v triletnem poskusnem obdobju

Table 3: Data associated with portion of successful and unsuccessful infections and assessment of tolerance of European chestnut to infections with *C. parasitica* during 3-year long experimental period

Delež uspešnih okužb (%): Portion (%) of trees where infections were successful:	Okužbe s sporami: Infection by spore:			Okužbe z micelijem: Infection by mycelium:		
	2001	2002	2003	2001	2002	2003
	50	84	60,5	88,4	95	91,05
Delež dreves, ki so bila ocenjena z enako oceno (%): Portion (%) of trees which received the same evaluation mark:						
Potencialno tolerantno drevo: Potentially tolerant tree:	/	0,5	/	/	0,5	/
MOB (less susceptible)	/	8,3	26,08	/	6,3	5,20
SROB (moderately susceptible)	26,9	9,5	11,30	50	5,3	12,13
OB (susceptible)	7,6	27,8	16,52	6,5	20,5	12,7
ZOB (highly susceptible)	65,4	54,4	40,95	43,4	67,9	69,9

Po triletnem ocenjevanju 200 dreves smo oceno potencialno odporno drevo podelili le enemu drevesu, to je drevesu št. 147, ki je bilo štirikrat ocenjeno z oceno MOB, še tri druga drevesa (drevo št. 167, ki je bila trikrat ocenjena z oceno MOB in enkrat z oceno (/) ali PO, drevo št. 181, ki je bila trikrat ocenjena z oceno MOB in enkrat z oceno MOB ali SROB in drevo št. 185, ki je bila dvakrat ocenjena z oceno MOB in dvakrat z oceno (/) ali PO) pa so kazala visoko stopnjo tolerantnosti. Pri njih je bil opazen dokaj stabilen odpornostni odziv.

Ker nam je že v letu 2003 uspela cvetna indukcija pri mnogih preučevanih mladih kostanjih na našem raziskovalnem polju smo omenjena štiri drevesa v letu 2004 uporabili za medsebojna križanja z namenom akumulacije genov odpornosti in drugih koristnih lastnosti in od njih tudi pridobili plodove. Na kostanje smo prenesli nekatera spoznanja ugotovljena pri preučevanju indukcije cvetenja na biotestnih rastlinah, kar je predstavljeno v članku Krajncič in Nemeč (2003). Oznako srednje občutljivo ali manj občutljivo drevo je dobilo 34 dreves od 200. Tudi med temi je nekaj zanimivih. Zanimiva so tista, kjer se je na vejicah razvil dobro viden rak, vendar se je širil počasi in ni povzročil sušenja vejic, kljub temu, da je gliva osvojila vsa tkiva okoli celotnega obsega veje. Pri teh drevesih lahko govorimo o hiperenzibilnostni reakciji na okužbo in hkrati visoki toleranci na naselitev glive v prevajalnih sistemih. Morda bi bilo pri odbiri dreves potrebno več pozornosti nameniti tistim, ki se sicer dokaj z lahkoto okužijo, vendar imajo veliko obnovitveno sposobnost in okuženost z glivo ne vpliva bistveno na gospodarske lastnosti dreves (notranja kakovost lesa,

izenačenost in razvejanost lesa, pridelek plodov, ...). Za ugotovitev stopnje tolerantnosti so potrebna dolgoletna opazovanja dreves v zelo različnih rastiščnih razmerah. Te razmere imajo velik vpliv na celosten tolerantnostni odziv rastlin. V okviru našega raziskovalnega dela smo preučevali tudi vpliv rastišča na tolerantnost dreves na okužbe, kar pa v tem prispevku ni predstavljeno. To nakazuje potrebo po spremembi tehnologij izkoriščanja gozdov (sprememba vrstne in tipske sestave sestojev, spremembe pri izvajanju sanitarnih ukrepov, ...) v smeri boljših rastiščnih razmer za drevesa.

Težko presodimo, koliko je naša metoda dela omogočila simulacijo dogajanja v naravi. Bolj naravne, kot okužbe z micelijem so gotovo okužbe s sporami. Okužbe skozi rane so v naravi nekaj povsem običajnega. Tudi v naravnih razmerah se na drevju pojavlja veliko ran skozi katere lahko vzkalijo spore glive. Obdobje opazovanja ima pomembno vlogo. Morda bi bilo smiselno opazovanja nadaljevati še v naslednji rasti dobi po okuževanju, kar bi zavleklo proces izbire, hkrati pa bi zmanjšalo možnost ponovnega testiranja z drugim izolatom glive. Zanimivi so primeri, ko je gliva v treh mesecih prodrla tudi do 30 cm v stran od mesta okuževanja, vendar je bila rakasta rana velika le en centimeter. V tem primeru bi gotovo morali čas opazovanja podaljšati.

Tehniko ocenjevanja je potrebno ovrednotiti tudi z vidika tehnike množitve potomcev. Pri vegetativno razmnoženem potomstvu lahko v krajšem času ocenimo več sevov in rezultati so bolj uniformni, pri potomstvu iz plodov dobimo bolj variabilne rezultate, ki kažejo populacijski odziv in ne odziv individualnega drevesa. Verjetno je najbolj smiselni začetek dela na potomstvu iz plodov in nato nadaljevati na vegetativno razmnoženih potomcih prve odbire.

4. DISKUSIJA IN SKLEPI

Rezultati kažejo, kako zelo variabilni so lahko rezultati takšne vrste raziskovanja odpornosti in kako zelo variabilen je odziv kostanjev na različne izolate glive v različnih ekoloških razmerah. Tudi videz rakastih sprememb se lahko iz leta v leto nekoliko spremeni, kar vpliva na hitrost propadanja lubja in na končne posledice okužb za drevo. O potencialno odpornih drevesih po treh letih testiranja ne moremo govoriti z veliko zanesljivostjo niti pri tistih drevesih, kjer okužba ni uspela, niti s sporami, niti z micelijem. Verjetnost, da je med njimi kakšno bolj odporno drevo je sicer nekaj večja, vendar še vedno majhna. Ne moremo vedeti, ali okužba ni uspela zaradi slabega postopka okuževanja ali zaradi dejanskih obrambnih učinkov dreves.

Glede na dosedanje rezultate se je ponovno pokazalo, da pri odbiri kostanjev potencialno odpornih proti okužbam z glivo *C. parasitica* zelo težko določimo zanesljiv indikator genske odpornosti. Prava neposredna aktivna odpornost v smislu uspešnega preprečevanja okužb in širitve glive v naravi verjetno pri kostanjih v primeru preučevane glive obstaja v izredno nizkem deležu (morda eno drevo na 500 000 dreves). Na to nakazujejo nekatera redka zelo vitalna kostanjeva drevesa (premer debela več kot 1 m), ki so skoraj popolnoma prosta rakavih ran. Verjetno se v naravi pojavljajo predvsem drevesa z višjo ali nižjo stopnjo tolerantnosti na okužbo. Takšna so se sposobna ohraniti dolga leta in oblikovati plodove, kljub temu, da je velik del njihove krošnje okužen z glivo.

V začetnem poskusnem obdobju smo prišli predvsem do velikega števila novih vprašanj, veliko manj pa do konkretnih odgovorov. Eno takšnih je, ali je odpornostni odziv tri leta starega drevesa enak več deset let starim drevesom? Pomembno je tudi vprašanje, ali so drevesa od katerih smo nabrali plodove zares tolerantna ali pa še sploh niso bila izpostavljena zares virulentnim sevom glive? Ocenjevanje odpornosti je potrebno narediti čim bolj zgodaj sicer se postopek odbire preveč zavleče. Pomembna je tudi gojitvena oblika mladih poskusnih dreves. Če imajo veliko razvitih vej lahko letno na istem drevesu stestiramo več izolatov glive. V treh letih bi pri idelanih drevesih verjetno lahko stestirali vsaj devet izolatov glive. Glede na začetne rezultate naše raziskave predlagamo izvajanje omejene množične selekcije pri potomcih pomembnih dreves, ki predstavljajo slovensko gensko banko kostanjev po shemi prikazani v diagramu 1. Predlagamo delo na način, da se od pomembnih dreves pobira

plodove in se vzgoji sadike. V starosti 2 do 3 leta se začne z izvajanjem okužb s sporami in z micelijem, hkrati pa se izvaja tretiranje s hormoni še boljše pa z ustreznimi kombinacijami kelatiranih (EDDHA vezanih) mikrohranil za indukcijo zgodnjega cvetenja, da se v okviru možnosti pospeši začetek cvetenja. Posamezno drevo je potrebno ocenjevati vsaj tri leta in ga izpostaviti vsaj 5 virulentnim sojem glive; ali iz celotnega ozemlja Slovenije, ali iz lokalnih populacij od koder je izviralno seme, če mislimo potomstvo vrniti nazaj na izvorna rastišča. V obdobju, ko je proces prvega kroga ocenjevanj končan pri 4 do 5 let starih drevesih prvič pustimo neovirano medsebojno oprasitev med tistimi, ki kažejo dobre ocene. Tako pridemo do prvega potomstva. Od tod naprej se delo diferencira glede na razpoložljiva sredstva. Pridobljeno seme (plodove) lahko preprosto vrnemo v sestoje od koder so izvirali starši in skušamo zagotoviti, da se razvijajo v nove rastline. S takšnim delom bi le nekoliko pospešili obnavljanje sestojev in v populaciji povečali delež dreves, ki so vsaj delno odporna. Delo je seveda možno nadaljevati z novim ciklusom množične odbire in dodatno izvajati individualno selekcijo vezano z vegetativnim razmnoževanjem, kot kaže diagram 1. Možnosti za vegetativno razmnoževanje kostanja so dobre tako, da bi bilo možno vegetativno razmnoženo potomstvo posaditi v kultivirane nasade. V nekaterih državah sadijo pravi kostanj v drevorede za obogatitev videza pokrajine (Agroforestry pristopi). Izbrana drevesa iz selekcije bi lahko v drevoredih lažje opazovali in nadalje preučevali.

Če bi večino plodov pridobljenih po prvem ciklusu množične odbire vrnili na prvotna rastišča, bi verjetno v naravnem sestoju nekoliko pospešili povečevanje deleža dreves z višjim odpornostnim odzivom, hkrati bi ta drevesa še vedno imela visoko stopnjo prilagoditve na izvorno rastišče, kar včasih pri postopkih večkratnih križanj izgubimo.

Dodatno lahko sklenemo še:

- uporabljena tehnika ocenjevanja tolerantnosti kostanjev na okužbe z glivo *C. parasitica* je uporabna tako s stališča kakovosti kvantifikacije odpornostnega potenciala, kot s stališča stroškov in je primerna za raziskovanje z malo sredstvi,
- rezultati okuževanja istega drevesa z istim sevom glive so lahko variabilni in so odvisni od termina okuževanja, od mesta okuževanja, od vremenskih razmer, od starosti drevesa, od načina povzročanja rane in mnogih drugih dejavnikov,
- pristop množične selekcije ima prednost pred individualno, zato da ne izgubimo lastnosti, ki oblikujejo prilagodljivost dreves na specifična rastišča,
- za resnejšo individualno selekcijo, ki je veliko dražja od množične, je potrebna uporaba tehnologije genskih markerjev, ki omogoča zgodnje odkrivanje potomcev z zeleno kombinacijo dednega zapisa, tako da se pri nadaljnjem delu lahko osredinimo le na majhno število potomcev,
- glede na razmerje med stroški in doseženim učinkom je za slovenske razmere verjetno bolj primerna omejena množična selekcija z enim ciklom za vzdrževanje potomstva manjšega števila zelo vitalnih dreves, ki uspevajo v tipičnih sestojih in predstavljajo slovensko gensko banko.

5. ZAHVALA

Predstavljeni rezultati so bili pridobljeni v okviru triletnega raziskovalnega projekta (Krajnčič, 2003) z naslovom Škodljivci in bolezni v gozdovih Slovenije ter varstvo gozdov (V4 – 0365), ki so ga sofinancirali: Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano RS, Ministrstvo za šolstvo, znanost in šport RS, Občina Hoče in Mestna občina Maribor. Vsem sofinancerjem projekta lepa hvala za zagotovljena sredstva.

6. LITERATURA

- Adams, J.M., Piovesan, G., Strauss, S., Bron, S. 2002. The case for genetic engineering of native and landscape trees against introduced pests and diseases.- *Conservation Biology*, 16, 4: 874-879.
- Allen, T.D. in Nuss, D.L. 2004. Linkage between mitochondrial hypovirulence and viral hypovirulence in the chestnut blight fungus revealed by CDNA microarray analysis.- *Eukaryotic Cell*, 3, 5: 1227-1232.

- Anagnostakis, S.L. in Aylor, D.E. 1984. The effect of temperature on growth of *Endothia* (*Cryphonectria*) *parasitica* *in vitro* and *in vivo*.- *Mycologia*, 76, 3: 387-397.
- Anagnostakis, S.L. 1992. Chestnut bark tannin assays and growth of chestnut blight fungus on extracted tannin.- *Journal of Chemical Ecology*, 18, 8: 1365-1373.
- Anagnostakis, S.L. 1992. Measuring resistance of chestnut trees to chestnut blight.- *Canadian Journal of Forest Research*, 22, 4: 568-571.
- Bazzigher, G. in Miller, G. 1982. Chestnut blight resistance breeding in Switzerland.- *North. Nut. Grow. Assoc. Annual Report*, 73: 38-45.
- Bazzigher, G. 1981. Selection of blight-resistant chestnut trees in Switzerland.- *European Journal of Forest Pathology*, 11, 4: 199-207.
- Bernatzky, R. in Mulcahy, D.L. 1992. Marker-aided selection in a backcross breeding program for resistance to chestnut blight in the American chestnut.- *Canadian Journal of Forest Research*, 22, 7: 1031-1035.
- Bissegger, M., Rigling, D., Heniger, U. 1997. Population structure and disease development of *Cryphonectria parasitica* in European chestnuts in the presence of natural hypovirulence.- *Phytopathology*, 87, 1: 50-59.
- Griffin, G.J., Hebard, F.W., Wendt, R.W., Elkins, J.R. 1983. Survival of American chestnut trees: evaluation of blight resistance and virulence in *Endothia parasitica*, *Phytopathology*, 73, 3: 1084-1092.
- Guerin, L. in Robin, C. 2003. Seasonal effect on infection and development of lesions caused by *Cryphonectria parasitica* in *Castanea sativa*.- *Forest Pathology*, 33, 4: 223-235.
- Hebard, F.V., Griffin, G.J., Elkins, J.R. 1984. Developmental histopathology of cankers incited by hypovirulent and virulent isolates of *Endothia parasitica* on susceptible and resistant chestnut trees.- *Phytopathology*, 74, 2: 140-149.
- Hillman B.I. in Suzuki, N. 2004. Viruses of the chestnut blight fungus.- *Advances in virus research*, 63: 423-472.
- Jurc, D. 1997. Biotično zatiranje kostanjevega raka z uporabo hipovirulence.- *Zbornik predavanj in referatov s 3. Slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, Portorož, 4.-5. marec 1997*, s. 291-297.
- Krajncič, B. in Nemeč, J. 2003. Mechanisms of EDDHA effects on the promotion of floral induction in the long-day plant *Lemna minor* (L.).- *Journal of Plant Physiology*, 160, s. 143-151.
- Krajncič, B. 2003. Zaključno poročilo o rezultatih raziskovalnega dela na projektu ciljnega raziskovalnega programa s fotografsko dokumentacijo in prilogami; Projekt: Škodljivci in bolezni v gozdovih Slovenije ter varstvo gozdov (V4 – 036500).- *Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo, Tehnološki center za gozdarstvo z botaničnim vrtom, Maribor*, 14. 10. 2003: 1 – 76.
- Kubisiak, T.L., Hebard, F.V., Nelson, C.D., Zhang, J.S., Bernatzky, R., Huang, H., Anagnostakis, S.L., Doudrick, R.L. 1997. Molecular mapping of resistance to blight in an interspecific cross in the genus *Castanea* using morphological, isozyme, RFLP and RAPD markers.- *Phytopathology*, 87, 7: 751-759.
- Lee, J.K., Tattar, T.A., Berman, P.M., Mount, M.S. 1992. A rapid method for testing the virulence of *Cryphonectria parasitica* using bark and wood of American chestnut, *Phytopathology*, 82, 12: 1454-1456.
- Milgroom, M.G. in Cortesi, P. 2004. Biological control of chestnut blight with hypovirulence: a critical analysis.- *Annual Review of Phytopathology*, 42: 311-338.
- Roane, M.K., Griffin, G. J., Elkins, J.R. 1986. Chestnut Blight – Other *Endothia* Diseases, and the Genus *Endothia*.- *APS Press, St. Paul, Minnesota, ZDA*, 53 s.
- Robin, C., Anziani, C., Cortesi, P. 2000. Relationship between biological control, incidence of hypovirulence, and diversity of vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* in France.- *Phytopathology*, 90, 7: 730-737.
- Rodriguez, J. in Colinas, C. 1999. Resistance test for chestnut against *Cryphonectria* (*Endothia*) *parasitica*.- *Proceedings of 2nd International Symposium on Chestnut, ISHS, Acta Horticulturae*, 494, 369-375.
- Schafleitner, R. in Wilhelm, E. 2002. Isolation of wound-responsive genes from chestnut (*Castanea sativa*) microstems by mRNA display and their differential expression upon wounding and infection with the chestnut blight fungus (*Chryphonectria parasitica*).- *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 61, 6: 339-348.