

Keskkonna Investeeringute Keskus

Metsanduse programmi 2010. aasta projekti nr. 26

Juuremädanike-seenpatogeenide ning invasiivsete seenhaiguste kahjustuste analüüs metsa- ja
pargipuudele kliimamuutuste kontekstis

lepingu nr. 11-10-8/416

täitmise aruanne

Lepingu täitja:
Eesti Maaülikool
Metsandus- ja maaehitusinstituut

.....
/Paavo Kaimre/

Aruande võttis vastu
ja kinnitas

.....

Tartu
2012

Sisukord	Lk.
Sissejuhatus	3
1. Kirjanduse ülevaade	4-10
1.1. Juurepess (<i>Heterobasidion</i> spp.)	4-7
1.2. Külmaseen (<i>Armillaria</i> sp.)	7-9
1.3. Saaresurm (<i>Hymenosyphus pseudoalbidus</i> , anamorf <i>Chalara fraxinea</i>)	9-10
2. KIKi projekti nr. 26 toel läbiviidud uuringute materjal ja meetoodika	11-15
2.1. Juurepessu isoleerimine	11
2.2. Külmaseene uurimine mitmetel puuliikidel ning nende esinemine saarte suremise protsessis	11-12
2.3. Invasiivste patogeensete seenhaiguste isoleerimine haiguskolletest	12
2.3.1. Saaresurma (<i>Hymenosyphus pseudoalbidus</i> , anamorf <i>Chalara fraxinea</i>) haigustunnustega saarevõrsete kogumine	12
2.3.2. Nulu-juurepess (<i>H. abietinum</i>)	12
2.4. DNA eraldamine	12-14
2.4.1 PCR produkti kontroll agarogeelis	13-14
2.4.2 Haigusetekitaja tüvede DNA Sekveneerimine Sangeri meetodil ja ITS järjestuste võrdlemine Geenipanga andmetega	14
2.5. Kunstlikud hariliku saare nakatamise katsed	14-15
3. Tulemused	15-19
3.1. Juurepessu isoleerimine	15-17
3.2. Külmaseene uurimine mitmetel puuliikidel ning nende esinemine saarte suremise protsessis	17
3.3. Invasiivste patogeensete seenhaiguste isoleerimine haiguskolletest	17-18
3.3.1. Saaresurma (<i>Hymenosyphus pseudoalbidus</i> , anamorf <i>Chalara fraxinea</i>) haigustunnustega saarevõrsete kogumine	17
3.3.2. Nulu-juurepess (<i>H. abietinum</i>)	18
3.4. Kunstlikud hariliku saare nakatamise katsed	18-19
3.4.1. Hinnang 4-5 kuud pärast nakatamist	18-19
3.4.2. Hinnang 11 kuud pärast nakatamist	19
4. Kokkuvõte	20
Kasutatud kirjandus	21-22
Lisa 1. Seemikute mõõtmis tulemused 4 ja 5 kuud peale nakatamist	

Sissejuhatus

Projekti „Juuremädanike-seenpatogeenide ning invasiivsete seenhaiguste kahjustuste analüüs metsa- ja pargipuudele kliimamuutuste kontekstis“ peamiseks eesmärgiks oli uurida Eesti metsades ulatuslikult levinud juuremädanike ja invasiivsete-patogeensete seeneliikide levikut ja kahjustusi ning võimalikke seoseid kliimamuutustega. Juuremädanike uurimisel keskenduti juurepessule ja külmaseenele, kui olulisematele metsa- ja pargipuude kahjustajatele. Analüüsiti ka invasiivset ja rahvusvahelist tähtsust omavat haigusetekiitajat saaresurma (*Chalara fraxinea*), kui võimalikku hariliku saare massilise hukkumise põhjustajat. Lisaks analüüsiti külmaseene olulisust hariliku saare suremisprotsessis. Hiidkooriku uue tüve katsetamine tehti 2011. aastal Lõuna-Soomes. Tulemused (Mgbeahuruike et al., 2011) näitasid, et seda tüve on võimalik edukalt rakendada juurepessu biotõrjel. Vastavaid katseid Eestis eraldi ei tehtud.

Koguti proove ka nulu erinevatelt liikidelt, et teha kindlaks kas muidu lõunapoolse levikuga nulu-juurepess on invasiivse liigina, arvestades võimalikke kliimamuutusi, esindatud ka Eestis.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Juurepess (*Heterobasidion* spp.)

Juurepess (*Heterobasidion* spp.) on juure- ja tüvemädaniku tekitaja parasvöötme okaspuumetsades. Ta on üks suuremat majanduslikku kahju põhjustav patogeen, mille negatiivne roll koos metsamajanduse intensiivistumisega on järjest suurenenud. Juurepessust tugevasti kahjustatud puistutes jääb metsaomanikul saamata suur osa (kuni 1/3) võimalikust metsatulust. Euroopa metsaomanikele tekitatav iga-aastane kahju on ca 790 miljonit eurot aastas (Woodward, *et al.*, 1998). Rootsis hinnatakse juurepessust põhjustatud kahjude suuruseks ca 2 milj. eur päevas (Stenlid, 2012, suulised andmed). Otsesele kahjule (puude kuivamisele, tuuleheitele, puidu kvaliteedi langusele) lisanduvad kaudsed kahjud nagu märgatav puidu juurdekasvu langus, raieringi lühendamise vajadus jne.

Juurepess tekitab nii juure-, kui tüvemädanikku peamiselt okaspuudel, vähem lehtpuudel, põõsastel ja puhmastaimedel, kuid tema iseärasuseks on võime pikka aega eksisteerida ka saprotroofina surnud puidus, kändudes ja raiejäätmetel. Meie metsades esineb kaks juurepessu liiki – kuuse-juurepess (*Heterobasidion parviporum*) ja männi-juurepess (*Heterobasidion annosum*), mis, nagu nimigi näitab, on spetsialiseerunud teatud kindlatele peremeestaimedele (Hanso, Hanso, 1999a). See spetsialiseerumine pole siiski absoluutne. Kuuse-juurepess (joonis 1) kahjustab meil peamiselt kuuske, aga võib nakatada ja surmata ka noori männitaimi, kui need lageraielangil istutatakse eelmisest metsapõlvkonnast pärinevate, juurepessu kandvate kuusekändude lähedusse.



Joonis 1. Juurepessu viljakeha hariliku kuuse juure all (R. Drenkhan foto).

Kuuse-juurepessu on leitud ka mitmetelt võõrokaspuuliikidelt (näit. *Abies sibirica*, *Larix* spp. *Pinus contorta*) ning mõnedelt kodumaistelt lehtpuudelt (*Betula pendula*). Männi-juurepess seevastu kahjustab igas vanuses mändi ja kadakat ning mitmeid lehtpuuliike, kuid on leitud ka

lehistelt. Harilikul kuusel esineb männi-juurepessu Eestis suhteliselt harva, meist lõuna poole liikudes aga üha enam.

Juurepessu viljakehad arenevad kändudel, lamapuidul, juurtel jm. Viljakehade valmimisel nendest vallanduvad eosed (basidiosporid) levivad peamiselt õhu kaudu ning leiavad idanemiseks soodsa substraadi värskelt paljastunud puidul (eriti kändude pinnal, kuid vahel ka suuremates tüve- ning juurevigastuste kohtades). Nakatumise intensiivsuse määrab õhus levivate eoste hulk, mis sõltub sporulatsiooni intensiivsusest, viimane aga sõltub omakorda õhutemperatuurist. Kõige intensiivsem eoste levimine on suvel ning madalaim eoste hulk õhus või peaaegu üldse mitte juurepessu eoseid - talvel.

Enamasti levib meie metsade õhus rohkesti mõlema juurepessuliigi eoseid, kuid männi-juurepessu eosed idanevad paremini värsketel männikändudel, kuuse-juurepessu eosed aga kuusekändudel (Korhonen, *et al.*,1994). Seega, juurepessuliigile omase peremeestaime (ka selle kännu) primaarne nakatumine eostega on üsna sage, mitteomasele peremeetaimele levib nakkus enamasti aga vaid vegetatiivselt, s.o juuresüsteemi kaudu edasi tungivate hüüfide abil. Idanevast eosest arenev seeneniidistik (mütseel) tungib kiiresti kännu puitu ja liigub sealt edasi - alla juurte suunas. Juurekontaktide kaudu levib haigus edasi lähi-naabruses kasvavate puude juurtele. Et samaliigiliste puude juured mullas ei kontakteeru mitte ainult füüsiliselt, vaid on sageli ka füsioloogiliselt kokku kasvanud (omavad ühist kambiumi), siis on patogeenil väga lihtne levida ühe puu (või näiteks hooldusraiel tekkinud kännu) juurtest samaliigilise naaberpuu juurtesse.

Männijuurtes levib juurepessu mütseel eriti piki maltspuidu välisosa ja surmab kambiumirakke, väga harva tõuseb mädanik tüves kõrgemale kui 20-30 cm maapinnast. See aga tähendab, et juurepessu poolt surmatud männi langetamise järel surma põhjust kännu pealt välja ei loe, erinevalt kuusest, mille kännul on juurepessu mädanik selgesti nähtav. Haigus areneb esialgu väliste sümptomiteta. Mida suurema osa juurtest mädanik haarab, seda selgemalt ilmnevad aga välised haigustunnused (eriti võrade hõrenemise näol). Kahjustatud juurtega puudel ilmneb aga igal juhul tugev kasvupidurdus, mis võib 5 aasta jooksul ulatuda kuni 40%-ni tervete puudega võrreldes. Kuivama hakkab puu siis, kui kahjustatud on üle 50% juurtest. Juuremädaniku tõttu kuivavad noored ja keskealised männid, küpses puistus muutuvad puud reeglina haiguse (juurepessu) suhtes resistentsemaks. Põhjuseks arvatakse olevat teatud keemiliste ühendite tekkimine puidus (G. Swedjemark, 2012, suulised andmed). Kuusepeenjuurtes kahjustab juurepess kõiki kudesid, jämedamates juurtes aga vaid tsentraalosa, sest eluspuidus avaldub mädaniku levimisele tugev tõrjereaktsioon. Kuuse juuresüsteemis arenev haigus on enamasti küllalt kaua ilma igasuguste maapealsete

sümptomiteta, arvatavasti seepärast, et kuusk on võimeline hävinenud peenjuurte asemele genereerima uusi. Juurtest liigub haigus (juurepessu mädanik) edasi tüve tsentraalossa, kus võib tõusta kuni 12 m kõrgusele maapinnast. Südamemädanik kuuskedes hakkab arenema enamasti ca 7 aastat peale esimest harvendusraiet, kusjuures juurekontaktide kaudu saadud nakkus (sekundaarne ehk vegetatiivne nakkus) on märgatavalt suurema ulatusega kui tüvehaavandite kaudu tuulega levinud eostest alguse saanud (primaarne) nakkus (Swedjemark, Stenlid, 1993).

Nii männi- kui kuusekändudes püsib juurepessu eostega nakatumise oht vaid lühikest aega (puu langetamisest/kännu tekkest vaid ca 24 tundi edasi), misjärel ilmselt kännu puidu niiskusesisaldus ja sellega koos ka vastuvõtlikkus primaarsele nakkusele tunduvalt väheneb (Stenlid, 1994). Haiguse levikuvõimaluste prognoosimisel puistus on oluline teada puistu ajalugu, sest mädaniku areng sõltub suurel määral infektsioonitasemest eelmises metsapõlves. Nakatunud kändudes võib haigusetehtaja, seega ka nakkusoht püsida enam kui 40 aastat (Piri, 1996). Nakatunud kännult levib mädanik juurekontaktide kaudu naabruses kasvavatesse puudesse, keskmine levimiskiirus eluspuude juurtes on 7-12 cm aastas, kändude juurtes aga kolm korda suurem, s.o kuni 30 cm (mõningail andmeil isegi 50 cm) aastas.

Siit tuleneb otsene vajadus leida võimalusi juurepessu leviku piiramiseks. Mitmesuguste metsakasvatustlike vigade vältimise (tihedad mono-, eriti istutuskultuurid, suvised raied jms.) kõrval on üheks tõhusamaks haiguse ennetamise võimaluseks kujunenud bioregulaatorite kasutamine, s.o värskete kändude asustamine juurepessule antagonistlike ja konkureerivate organismidega.

Läbi on uuritud sadade looduslikult juurepessuga samas biotoobis elunevate, erinevatesse organismirühmadesse kuuluvate štammide vastastikused suhted juurepessuga (Woodward, *et al.*, 1998). Juurepessule antagonistlike organismide otsingutes on osalenud ka Eesti teadlased (Hanso, Hanso, 1985, 1992). Erinevates riikides on patenteeritud kümneid potentsiaalseid bioregulaatoreid juurepessu vastu. Juurepessu bioregulatsiooni võimaldavaks organismiks on kujunenud saprotroofse kandseene hiidkooriku (*Phlebiopsis gigantea*) põhjal valmistatud preparaat ROTSTOP®. Bioregulaator ROTSTOP preparaati toodetakse tööstuslikult Soomes. ROTSTOP on Soomes ametlikult kasutusel 1992. aastast. Preparaat on bioloogiline toode, mis sisaldab elusaid hiidkooriku eoseid (oiide) ja pidurdab juurepessu levikut nii kuuse- kui ka männikändudes, on loodusesõbralik, väga lihtsalt kasutatav toode, mis sobib kasutamiseks nii harvesteriga kui käsitsi kändude töötlemiseks. Eestis on ROTSTOP® ametlikult registreeritud alates 27.04.2004 (reg. nr. 0252). Preparaadi levitajaks on AS Baltic Agro. Avamata pakendis säilib preparaat kasutamiskõlblikuna kuni + 8°C juures 12 kuud, kõrgemal temperatuuril vaid

Patogeensete seente levikul ja kahjustuste tekkimisel on väga olulised kliima tingimused: keskmine temperatuur, niiskus, geograafiline asukoht ja kõrgus maapinnast. Kahjustuste tekkimine ja arenemine sõltub veel paljudest teguritest: mikrokliimaatilised tegurid, peremeestaime vanus ja elujõulisus, patogeeni inokulumi potentsiaal, peremeestaime tihedus puistus, puistu ajalugu, eelnev puistu majandamine, peremeestaime vanus ja liigiline koosseis, patogeeni leviku vektor, bioloogilise kontrolli vahendid jne. (Gerlach, et al., 1997, Klopfenstein et al., 2009).

Ilmastikus toimuvad muutused (ekstreemsed ilmastiku tingimused) mõjutavad (suurendavad või vähendavad) metsahaiguste taset ja patosüsteemi (peremees, parasiit, keskkond). Seene leviku prognoosimiseks koostatakse mudeleid, mille aluseks ongi muuhulgas ka eelpool nimetatud andmed (keskmine temperatuur, niiskus, geograafiline asukoht ja kõrgus maapinnast). Siiski on patogeeni levikut raske väga täpselt prognoosida, peamiselt seepärast, et seene leviku andmeid on raskem kätte saada võrreldes peremeestaime omadega. Kuid, muutuvad ilmastiku tingimused muudavad patogeeni leviku arengustsenaariume ja mõjutavad ka metsade majandamist. Külmasene juuremädanikest ohustatud metsade majandamiseks on mitmeid soovitusi: 1) eelistada kodumaiseid puuliike, mis on vähem vastuvõtlikud külmaseenest tingitud juuremädanike suhtes, võõrliikidele, 2) uuendada metsa seemnelise päritolu taimedega 3) vältida puudele vigastuste tekitamist 4) biotõrje vahendite kasutamine metsaraiel (Klopfenstein et al., 2009).

Haiguse levikut soodustavad stressitegurid, mis pärsvivad puude kasvu ja arenemist – mulla liigne kuivus, putukate kahjustused jms. Puistus nõrgendavate tegurite ilmumisel saprofüüdina toitunud külmaseen võib üle minna parasiidiks kasvavatele puudele, seetõttu peetakse kahjustusohu suurendavateks teguriteks vanade kändude ja puidujäätmete rohkest metsas (Tamm, 2002). Brazee et al., 2011 järgi on teada, et külmaseen nakatab ka väikese diameetriga stressi seisundis hariliku männi kändusid, kuid jämedama diameetriga männid on sageli kahjustusele resistentsemad. Haigus on ohtlikum tihedamates puistutes (Gerlach, et al., 1997), kus patogeen puude tiheda asetuse tõttu võib risomorfide abil kiiresti ühelt puult teisele kanduda. Seetõttu esineb külmaseene kahjustus peaaegu alati rühmiti (Tamm, 2002). Külmasene poolt tekitatud juuremädanik põhjustab olulist puidu juurdekasvu vähenemist (18-aasta vanuses *Pseudotsuga menziesii* puistus kuni 40% puidu juurdekasvu vähenemist 4 kuni 8 aastaga) (Cruickshank 2000).

Külmaseene tõrje on selle massilise esinemise ning laialihargnevate risomorfide tõttu raskesti läbiviidav. Tõhusamaks tõrjeviisiks on hoolikas sanitaarraie, mõnel juhul koos kändude

juurimisega. Tugevate kahjustuste korral tuleks puistu likvideerida enne raieküpseks saamist (Tamm, 2002). Kahjustuste vähendamiseks või ennetamiseks tuleks vältida okaspuude monokultuuride rajamist ja võimalusel raielangid uuendada okaspuu- ja lehtpuu segametsadega (Gerlach, et al., 1997).

1.3. Sauresurm (*Hymenosyphus pseudoalbidus*, anamorf *Chalara fraxinea*)

Hariliku saare allakäik Euroopas on tõsine probleem ja kahjustatud piirkonnad laienevad kiiresti, kuid hoogustunud on ka asjakohane teaduslik uurimistöö. Esimest korda märgati hariliku saare hulgisuremist 1990. aastate keskel Leedus ja Poolas. Sauresurma tekitajal (*Chalara fraxinea*) on omad kindlad ja äratuntavad haigustunnused saareliikide (*Fraxinus* sp.) lehtedel, võrsetel ja ka võra üldilmes. Esmaseks haigustunnuseks on lehtede ja seejärel leherootsude tumenemine ning närbumine. Sellele järgneb võrsetest algav koorenekroos. Esimesena hukkuvad lehed ja võrsed, seejärel tüve ja jämedamate okste kambium. Piisab ainult kahest-kolmest kuni kümnest aastast puu hukkumiseni (joonis 3).



Joonis 3. Surevad saared Tartumaal, Ülenurmes (Rein Drenkhan'i foto)

Pruune kuni mustjaid nekrootilisi laike leidub nii okste kui ka võrsete tippudel. Kirjeldatud laikude suurenemisel võrsed hukkuvad. Sauresurmast nakatunud ja kahjustunud puud püüavad algstaadiumis taastada veel oma võra, kasvatades vesivõsusid. Peagi nakatuvad needki ja kuivavad, millele järgneb puu hukkumine. Nekrootilised laigud saavad enamasti alguse pungast, noorest võrsest või lehe aluselt (Kowalski ja Holdenrieder 2008; Drenkhan ja Hanso 2009a). Saarte suremise põhjused on veel ebaselged. Üks osa metsapatoloogide arvavad, et peamiseks saarte hukkumise põhjuseks on äärmuslikud ilmastikuolud, milleks on peaaesjalikult ilmastiku ekstreemsused või nende kombinatsioonid s.o varajased äkilised

sügised, külmad talved, kevadised hilis-külmad ning isegi põuased suved. Teiste arvates on saarte massilise suremise põhjuseks kompleksne nähtus, mis on tingitud ilmastiku ekstreemsustest ning seejärel nõrgestatud peremeestaimi ründavatest patogeenidest ehk eelkõige seenhaigustest. Kolmandate arvamusel kohaselt on saarte massilise hukkumise põhjustajaks ainuüksi patogeensed seenhaigused (Drenkhan ja Hanso 2009a; Rytönen *et al.* 2010).

Sauresurma uuringud Euroopas andsid hiljuti uue tähtsa tulemuse: selgus, et saari kahjustab sama seeneperekonna teine ja ühtlasi teadusele uus liik *Hymenoscyphus pseudoalbidus* (Queloz, *et al.*, 2011), mida saab osaliselt seostada kliima muutustega. Varem leitud *H. albidus* on üksnes saare leherootsude süütu saprobiontne lagundaja. Mõlemal liigil, nii *H. pseudoalbidus*'el kui ka *H. albidus*'el, on kahvatud valkjaskreemikad kuni pruunid tsentraalse jalaga viljakehad; nende läbimõõt on kuni kolm millimeetrit. Viljakehad moodustuvad enamasti saare mullustel mahavarisenud leherootsul (joonis 4).



Joonis 4. Sauresurma tekitaja *Hymenosyphus pseudoalbidus* viljakehad hariliku saare leherootsul (R. Drenkhani foto).

Välisrühmade põhjal ei ole võimalik nendel kahel seeneliigil vahet teha, küll aga DNA järgi. Uue liigi päritolu ja hiiglasliku haiguspuhangu kujunemise tagamaad Euroopas ei ole veel teada. Ühe versiooni järgi on patogeeni (*H. pseudoalbidus*) või selle patogeeni virulentset mutanti saareistikutega Euroopasse korduvalt introducteeritud, kuid lähtekohta ei teata. Varasemad väiksemate mõõtmetega kahjustused võisid jääda märkamatuks (Queloz, *et al.*, 2011). Eestis on sauresurma samuti uuritud (Drenkhan, Hanso, 2009a; Drenkhan, Hanso, 2009b; Jürgenstein, 2011; Drenkhan *et al.*, 2012). Kuigi, metsamajanduslikus mõttes ei kuulu harilik saar Eestis tulu toovate puuliikide hulka, väärivad sauresurm tähelepanu, sest harilik saar on metsades elurikkuse seisukohalt väga oluline liik ning hinnatud puu ka linnahaljastuses. Rootsis on sauresurmast tingitud kahjustuste tõttu harilik saar kantud punasesse nimestikku (Stenlid *et al.*, 2011).

2. KIKi projekti nr. 26 toel läbiviidud uuringute materjal ja metoodika

2.1. Juurepessu isoleerimine

Juuremädanike kahtlusega harvendusraie puistutest võeti juurdekasvuproovid harilikult männilt viiest ja hariliku kuuse puhul kaheteistkümnest puistust Lõuna-Eestis. Kõikidest võetud proovidest üritati laboratoorselt välja kasvatada juuremädaniku tekitajaid. Puistud valiti Võrumaa metskonnast (Antsla metsandik), Tartumaa metskonnast (Tartu metsandik) ja Järvselja Öppe- ja Katsemetskonnast. Katsealade valimisel kasutati teadaolevaid andmeid juurepessu esinemise kohta puistutes. Kasutades juurdekasvupuuri, võeti igalt alalt keskmiselt viie puu juurdekasvuproovid. Juurdekasvupuuri desinfitseeriti iga proovi võtmise vahepeal. Puursüdamikud pandi metsas puhastesse kilekottidesse. Kilekotti lisati veidi vett, et tekitada sobiv keskkond juurepessu viljakehade väljakasvamiseks puidust. Juurepessu (*Heterobasidion* spp.) identifitseeriti mikroskoobi all seene suguta arengujärgu (konidiaalse staadiumi *Oedocephalum* Preuss.) eospeade järgi. Puud, millest juurdekasvuproovid võeti, nummerdati (joonis 5), et oleks teada nende järjekorra number.



Joonis 5. Tartumaa metskonnas harvendusraie alal nummerdatud puud (T. Drenkhan foto).

Valitud puistud ja puud jäävad edaspidiseks uuringuteks ja jälgimiseks ning alased plaanitakse külastada ka järgnevate juuremädanikega seotud projektide raames, näiteks KIKi projekti nr. 3698. Juba valitud ja lisanduvatel aladel jälgitakse juurepessu arengut erinevates staadiumites. Mädaniku ulatuse hindamiseks tehakse kordusmõõtmisi kahe aasta järel resistograafi abil. Andmeid on võimalik kasutada juurepessu kahjustuste modelleerimise ja mudeli väljatöötamiseks.

2.2. Külbaseene uurimine mitmetel puuliikidel ning nende esinemine saarte suremise protsessis

Analüüsiti külbaseene (*Armillaria* sp.) liigilist koosseisu peamiselt harilikul saarel (*Fraxinus excelsior*), aga ka teistelt leht- ja okaspuudelt. Külbaseene (*Armillaria* spp.) proove (puude juurdekasvuproovid ja risomorfid) koguti üheksast pargist üle Eesti (Ülenurme, Sagadi, Toila

Oru, Luua, Ahja, Vastse-Kuuste, Sangaste, Luke, Mooste). Hariliku saare puhul koguti juurdekasvuproove. Kui samas asukohas (pargis) märgati ka teistel puuliikidel (enamasti kändudel) külmaseene risomorfe, siis koguti ka neid. Proovid (juurdekasvuproovid ja risomorfid) transporditi steriilsetes kilekottides laborisse ning pandi kasvama virde agar söötmele. Koguti külmaseene viljakehi erinevatelt puuliikidelt külmaseene liigilise koosseisu uurimiseks. Proovid toodi: hariliku saare kännult (Tartu maakond, Ülenurme vald), hariliku kuuse tüvelt ja juurtelt, poolkuivanud arukaselt (Tartu maakond, Elva linn), elava aruakse tüve jalamilt (Jõgeva maakond, Saare vald). Eesmärgiks oli määrata metsa- ja pargipuid kahjustavate külmaseente liike. Analüüsiti kogutud viljakehade morfoloogilisi tunnuseid ning tehti külvid puhaskultuurid. Liigi määramiseks kasutati molekulaarseid metoodeid.

2.3. Invasiivste patogeensete seenhaiguste isoleerimine haiguskolletest

Invasiivsete patogeensete seeneliikidena käsitletakse käesolevas töös saaresurma (*Chalara fraxinea*) kahjustusi ning püstitatakse hüpotees nulu-juurepessu (*H. abietinum*) võimaliku esinemise kohta Eestis.

2.3.1. Saaresurma (*Hymenosyphus pseudoalbidus*, anamorf *Chalara fraxinea*) haigustunnustega saarevõrsete kogumine

Haigustunnustega hariliku saare leherootse ja võrseid korjati viiest asukohast: Jüri-Hansu kinnistult ja Lelle alevikust Raplamalt, Ülenurmelt ja Järveljalt Tartumaalt, Sürgaverelt Viljandimaalt ning Pärnumaalt. Proove koguti suhteliselt noortelt puudelt s.o vanuses viis kuni kümne aastat ja ainult harilikult saarelt, looduslikest puistutest ja uuenenud raielankidelt.

Haigustunnustega võrse osa eemaldati puult käsisaie või pussnoa abil. Proovid pakendati kilekottidesse, mis markeeriti asukoha ja kuupäevaga. Proove hoiti külmkapis temperatuuril +4 °C kuni haiguse isoleerimiseni.

2.3.2. Nulu-juurepess (*H. abietinum*)

Erinevate nulu liikide tervisliku seisundi jälgimisel on täheldatud puude kuivamist ja kiratsemist. Seepärast koguti paarist kohast üle Eesti (Anija metskond, Järvelja ÖKM, Sangaste park) erinevatelt nulu liikidelt juurdekasvuproove.

2.4. DNA eraldamine

DNA saab eraldada puhaskultuurist ja viljakehast. DNA eraldamiseks kasutati spetsiaalset seentele mõeldud kit'i E.Z.N.A. FUNGAL DNA Mini Kit (Omega Bio-Tek, Inc.). Eraldamisel järgitakse spetsiaalset tootjapoolset protokollit ning eraldatud DNA säilitati kuni

PCR segu valmistamiseni sügavkülmikus temperatuuril -20°C. PCR viidi läbi kasutades ühel juhul (külmaseen) seene universaalset ja teisel juhul liigispetsiifilist (*C. fraxinea*) praimerit. PCR reaktsiooniks kasutati valmis segu BioDyne 5x HOT FIREPol Blend Master Mix Ready to Load with 10mM MgCl₂ (Solis BioDyne) 4µl reaktsiooni kohta, lisati 0,5 µl (20 µM) kumbagi praimerit (seente universaalpraimerid: ITS1F ja ITS4 või sauresurma tekitaja *Hymenoscyphus pseudoalbidus*'e spetsiifilisi praimerid: CHA-F1 ja CHA-R2), 1 µl DNA-d ja 14 µl ddH₂O'd) niipalju, et reaktsioonisegu lõppkogus oli 20 µl.

Kasutatud praimerid ja nende järjestused olid järgmised:

1. *C. fraxinea* puhaskultuurist ja *Hymenoscyphus* sp. viljakehadest eraldatud DNA ITS piirkondade amplifitseerimiseks kasutati kõrgemate seenerühmade praimerit ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') (Gardens ja Bruns 1993) ning seente universaalpraimerit ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White jt. 1990).
2. *C. fraxinea* puhaskultuurist ja *Hymenoscyphus* sp. viljakehadest eraldatud DNA ITS piirkondade amplifitseerimiseks kasutati *C. fraxinea* spetsiaalpraimereid CHA-F1 (5'-GGTTTCACTCCTGAACAACGA-3') ning CHA-R2 (5'-GACCCTATCGCGAGAAGAATT A-3') (Husson *et al.* 2011). Vastavad *C. fraxinea* spetsiaalpraimerid telliti Saksmaa firmast, Eurofins MWG GmbH.

Uuritava proovi DNA ITS piirkonna amplifitseerimised viidi Termocycleril Biometra, Tprofessional (Saksamaa). PCR'i programmi etapid ja nende pikkused olid universaalpraimeritega (ITS1F ja ITS4) järgnevad: eelkuumutamine +95° C, 13 minutit, millele järgnes 35 tsüklit: a) DNA denaturatsioon temperatuuril +95° C, 15 sekundit, b) praimerite seondumine +55° C, 40 sekundit ja c) DNA ahela süntees +72° C, 1 minut. Final elongation (lõppekstensioon) toimus 7 minuti jooksul +72°C juures, seejärel jahutati proovid +16°C ja säilitati nimetatud temperatuuril kuni aparadi seiskamiseni. PCR'i programmi etapid olid *C. fraxinea* spetsiaalpraimeritega (CHA-F1 ja CHA-R2) samad, v.a praimerite seondumise temperatuur, mis oli + 58,5°C. Proovid säilitati kuni järgmiste analüüsideni külmikus temperatuuril -20 °C.

2.4.1 PCR produkti kontroll agarogeelis

Esmalt valmistati nn. suur 2% agarosogeel, mis sisaldas 3 g agarooosi (Agarose, Naxo OÜ), 150 ml 0,5xTBE-d (Trisboraat-EDTA, Sigma) puhvrit ning 4µl etiidiumbromiidi (EtBr, Naxo OÜ). PCR'i produkt sisaldas kollast värvust (yellow dye), seega sai proovid kanda kohe geeli, peale

selle tahkumist. Seejärel laeti geeli DNA Ladder, DNA fragmendi pikkusega vahemikus 100 – 1000bp (Naxo OÜ). Järgnes PCR-i produkti elektroforees 2 % agarosogeelis 100 V pinge juures 60 min. Amplifitseeritud DNA lõigu olemasolu ja vastava lõigu pikkus geelil tehti kindlaks UV kiirte all vastava pildistamissüsteemiga. Geelipilt transporditi arvutisse ja töödeldi tarkvaraga Adobe Photoshop Elements 2.0.

2.4.2 Haigusetkitaja tüvede DNA Sekveneerimine Sangeri meetodil ja ITS järjestuste võrdlemine Geenipanga andmetega

ITS piirkonna järjestused sekveneeriti ainult *C. fraxinea* puhaskultuuridest ja *Hymenoscyphus* sp. viljakehadest eraldatud ja PCR'i abil amplifitseeritud DNA'st. Vastavad PCR produktide sekveneerimine tehti Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudis, kus teostati ka DNA puhastamine. Sekveneerimiseks kasutati praimerit ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (White *et al.* 1990). Saadud DNA järjestused analüüsiti programmiga Bioedit 4.8 (Gene Codes, AnnArbor, USA), mille abil DNA järjestuste otsad kustutati ning vajadusel järjestuse ebaselged kohad parandati. Saadud tulemusi võrreldi rahvusvahelises geenipangas (National Center for Biotechnology Information 2011) olevate ITS järjestuse andmetega.

2.5. Kunstlikud hariliku saare nakatamise katsed

Hariliku saare (*F. excelsior*) kunstlikud nakatamiskatsed on läbiviidud kolmel katsealal – Järveljas ja Nõgiarus Tartumaal ning Aimlas Viljandimaal. Nakatamiskatseid teostati selleks istutatud hariliku saare taimedel (loomulikus looduskeskkonnas) kahe teadolevalt erineva saaresurma tekitava patogeense seenega (*Chalara fraxinea*, *Diplodia mutila*). Järvelja ÕKMs, Rõkal istutati hariliku saare seemikud 2011. aasta kevadel. Puude nakatamine tehti mõned kuud hiljem (05.07.2011). Viljandimaal, Aimlas ja Tartumaal, Nõgiarus istutati seemikud 2010. aasta kevadel. Puukeste nakatamine tehti vastavalt 07.07.2011. ja 10.07.2011. Igal katsealal nakatati seemikuid nii *Chalara fraxinea* (12 seemikut), kui ka *Diplodia mutila*'ga (12 seemikut). Taimedele pandi ümber sinised plastikust juurekaela kaitsetopsid ning *C. fraxinea*'ga nakatatud puude eristamiseks tehti topsile oranz märke ja *D. mutila*'ga nakatatud seemikute topsile tehti märke sinise värviga.

Kontrolltaimed tähistati puidust vaia ja kollase lindiga (5 või 10 puud katseala kohta). Seemikute nakatamiseks külvati laboris Petri tassidele nii *C. fraxinea*, kui ka *D. mutila* kultuurid. Kui kultuurid olid kasvanud kaks nädalat, siis asetati igasse Petri tassi õhuke 2cm

pikkune hariliku saare steriliseeritud puidutükk. Pärast seda, kui puidulaastuke oli üle kasvanud patogeeniga, viidi läbi nakatamiskatsed looduses. Selleks tehti istutatud h. saare seemikute tüvekestele steriilse skalpelli abil risti tüve 0,5 cm ja piki tüve 2-2,5 cm pikkune sisselõige (Kowalski, Holdenrieder, 2008). Nakatamiste vahepeal desinfitseeriti skalpelli piiritses. Eelnevalt kirjeldatud puidutükid pandi saare koorelõhedesse ning lõige kinnitati steriilse läbipaistva kile abil. Kontrolltaimedele asetati sisselõikesse samas suuruses puidutükike, mis polnud seenega nakatatud.

Seemikute kasvu katsealadel hinnati 4-5 ja 11 kuud peale nakatamist. Seemikute mõõtmisi teostati Rõkal 4 kuud ja Aimplas 5 kuud peale nakatamist. Visuaalsel vaatlusel hinnati nekrootiliste laikude (joonis 6) olemasolu ja/või puudumist ning taimede üldist tervislikku seisundit. Täpsema hinnangu andmiseks eemaldati nakatatud kohalt kile ja mõõdeti kahjustatud puiduosa (sisselõike kohalt) pikkus ja laius.



Joonis 6. Nekrootilised laikud hariliku saare võrsel

Nõgiarus 5 kuud peale nakatamist olid seemikud väliselt kõik terved ja mõõtmised puuduvad (polnud midagi mõõta). Seemikud lõigati juurekaelalt ning toodi laborisse. Laboris eemaldati vigastatud kohalt puukestelt koor ning isoleeriti kahjustunud ja terve puidu piirilt puidutükike virde agar söötmele. Samuti toimiti Rõka ja Aimpla katsealadelt toodud saare seemikutega 11 kuud peale nakatamist.

3. Tulemused

3.1. Juurepessu isoleerimine

Juurepessu (*Heterobasidion* spp.) identifitseeriti kahest hariliku männi ja kümnest hariliku kuuse puistust (tabel 1).

Tabel 1. Harvendusraie puistud, milles tehti kindlaks juurepessu (*Heterobasidion* spp.) esinemine

asukoht (metsandik)	kvartal/ eraldus	kogumise kuupäev	puuliik	substraat (analüüsitud puude arv)	patogeen
Võrumaa Vällamäe		24.05.2011	h. kuusk	viljakeha	<i>Heterobasidion</i> spp.
Järvselja ÕKM		07.06.2011	h. kuusk	juurdekasvu proov (10 puud)	<i>Heterobasidion</i> spp.
Tartumaa (Tartu metsandik)	TT113/10	03.10.2011	h. kuusk	juurdekasvu proov (5 puud)	<i>Heterobasidion</i> spp.
Tartumaa (Tartu metsandik)	TT113/2	03.10.2011	h. kuusk	juurdekasvu proov (5 puud)	<i>Heterobasidion</i> spp.
Tartumaa (Tartu metsandik)	KS242/9	04.10.2011	h. kuusk	juurdekasvu proov (5 puud)	<i>Heterobasidion</i> spp.
Tartumaa (Tartu metsandik)	QT066/3	21.09.2011	h. kuusk	juurdekasvu proov (5 puud)	<i>Heterobasidion</i> spp.
Tartumaa (Tartu metsandik)	QT048/7	07.09.2011	h. kuusk	juurdekasvu proov (5 puud)	<i>Heterobasidion</i> spp.
Tartumaa (Tartu metsandik)	QT051/6	07.09.2011	h. kuusk	juurdekasvu proov (5 puud)	<i>Heterobasidion</i> spp.
Tartumaa (Tartu metsandik)	QT052/11	08.09.2011	h. kuusk	juurdekasvu proov (5 puud)	<i>Heterobasidion</i> spp.
Tartumaa (Tartu metsandik)	QT048/11	07.09.2011	h. kuusk	juurdekasvu proov (5 puud)	<i>Heterobasidion</i> spp.
Võrumaa (Antsla metsandik)	353/18	03.08.2011	h. mänd	juurdekasvu proov (5 puud)	<i>Heterobasidion</i> spp.
Võrumaa (Antsla metsandik)	447/7	05.08.2011	h. mänd	juurdekasvu proov (3 puud)	<i>Heterobasidion</i> spp.

Harvendusraie puistutes täheldati hariliku kuuse puhul patogeeni poolt nakatunud puudel, sõltumata vanusest, eelkõige tugevat vaigujooksu tüvedel. Teisi väliseid iseloomulikke

tunnuseid märgati vähem. Hariliku männi puhul identifitseeriti juurepessuga nakatunud puudelt, sõltumata vanusest, ladvaokste kuivamine.

3.2. Külbaseene uurimine mitmetel puuliikidel ning nende esinemine saarte suremise protsessis

Külbaseent (*Armillaria* spp.) identifitseeriti seitsmest pargist (Ülenurme, Sagadi, Toila Oru, Luua, Ahja, Vastse-Kuuste, Sangaste) üle Eesti (tabel 2). Liigina määrati enamasti tutt-külbaseene (*A. cepistipes*) esinemine.

Tabel 2. Külbaseene isoleerimine parkidest

asukoht	isoleerimise kuupäev	puuliik	substraat	määratud liik
Ülenurme park	14.09.2011	h. saar	risomorfid	
Sagadi mõisa park	13.10.2011	tamm	risomorfid	
		h. saar	puursüdamik	
Toila Oru park	13.10.2011	h. saar	puursüdamik, risomorfid	<i>A. cepistipes</i>
		arukask	risomorfid	
Luua mõisa park	14.10.2011	h. saar	puursüdamik, risomorfid	<i>A. cepistipes</i>
Ahja park	25.11.2011	h. kuusk	risomorfid	
		h. tamm	risomorfid	<i>A. cepistipes</i>
Vastse-Kuuste park	30.11.2011	h. saar	puursüdamik, risomorfid	
		h. kuusk	risomorfid	<i>A. cepistipes</i>
Sangaste	11.05.2012	h. saar	puursüdamik	

Ahja pargist isoleeriti külbaseent hariliku kuuse ja hariliku tamme kändudelt kogutud risomorfidest. Luke ja Mooste pargist külbaseene isoleerimine ebaõnnestus.

3.3. Invasiivste patogeensete seenhaiguste isoleerimine haiguskolletest

3.3.1. Saaresurma (*Hymenosyphus pseudoalbidus*, anamorf *Chalara fraxinea*) haigustunnustega saarevõrsete kogumine

Hariliku saare võrsetelt leiti saaresurm (*C. fraxinea*) järgmistest asukohtadest: Jüri-Hansu kinnistu ja Lelle alevik Raplamaalt, Ülenurme ja Järvelja Tartumaalt, Sürgavere Viljandimaalt ning Pärnumaalt. Kõikidest puhaskultuuridest õnnestus sekveneerida ITS piirkonna DNA järjestus, mis kõik sarnanesid 100% rahvusvahelise geenipanga (National Center for Biotechnology Information 2011) järjestustega ning osutusid seega saaresurma tekitajaks *Hymenoscyphus pseudoalbidus* (anamorf *C. fraxinea*).

Hariliku saare leherootsudele võetud *Hymenoscyphus* sp. viljakehade ITS piirkonna sekveneerimine õnnestus ainult Jüri-Hansu ning Ülenurme proovidest. Olulise tulemusena selgus, et nimetatud proovide ITS piirkonna DNA järjestused kinnitavad liigiks *Hymenoscyphus pseudoalbidus* (anamorf *C. fraxinea*). Nimetatud proovide tulemus kattub 100% rahvusvahelise geenipanga (National Center for Biotechnology Information 2011) vastava liigi järjestustega.

3.3.2. Nulu-juurepess (*H. abietinum*)

Anijalt ja Järvelja ÕKMst toodud proovidest juurepessu välja ei kasvanud. Juurepessu koniidid kasvasid välja ühest Sangastest pärinevast juurdekasvuproovist. Liik jäi identifitseerimata.

3.4. Kunstlikud hariliku saare nakatamise katsed

3.4.1. Hinnang 4-5 kuud pärast nakatamist

Seemikute mõõtmistulemused Rõkal 4 kuud ja Aimlas 5 kuud peale nakatamist (lisa 1) näitasid, et *C. fraxinea* nakatatud taimedel oli iseloomuliku nekrootilise laigu pikkus keskmiselt: Rõkal 3 cm, Aimlas 7 cm. Samal ajal *D. mutila* nakatatud taimedel oli kahjustuse keskmine pikkus Rõkal 1,95 cm ja Aimlas 2,1 cm. Kontrolltaimedel nekrootilisi laike ei olnud. Nõgiarvus 5 kuud peale nakatamist olid seemikud väliselt kõik terved ja mõõtmised puuduvad (polnud midagi mõõta). Aga, nakatatud taimede proovidest isoleeriti *C. fraxinea* kahest kultuurist (joonis 7).



Joonis 7. *C. fraxinea* puhaskultuur virde agar söötmel

4. Kokkuvõte

Projekti tulemusel isoleeriti ja täiendati EMÜ metsapatoloogia seenekultuuride kogu olulisemate juuremädanike tekitajatega (juurepess ja külmaseen) mitmetest harvendusraie puistutest ning parkidest. Harvendusraiate tegemise aeg on viimastel aasta(kümne)tel selgelt nihkunud suviste raiete suunas. Harvendusraie puistutest kogutud juuremädanike proove analüüsides selgus, et juba harvendusraie (20-40 aasta) ealised puistud on juuremädanikest oluliselt nakatunud. Kui juurepessu olulisus juuremädanike tekitajana on enam teada fakt, siis sageli alahinnatakse külmaseene tähtsust. Näiteks hariliku saare suremisprotsessis on lisaks *C. fraxinea* esinemisele väga oluline tähendus ka külmaseente, küll aga, sekundaarsetel kahjustustel. Harilikult saarelt isoleeritud külmaseene liigilise koosseisu määramisel esines kõige enam tutt-külmaseent (*A. cepistipes*). Seega saab osaliselt seostada saarte suremist ka külmaseenega. Kui külmaseene puhul peetakse tõhusaimaks tõrjeviisiks hoolikat sanitaarraiet, mõnel juhul koos kändude juurimisega, siis kändude kaitsmiseks juurepessu nakkuse vastu soovitame jätkuvalt kasutada preparaati ROTSTOP, sest see on praegusel hetkel üks tõsiseltvõetavamaid võimalusi juurepessu kahjustuste vähendamiseks just tulevastes metsapõlvedes. Hariliku saare seemikute nakatamisel invasiivsete patogeense seeneliikide *C. fraxinea* ja *D. mutila* leiti, et mõlemad seeneliigid põhjustavad harilikul saarel meie looduslikes tingimustes tüve kambiumis vähemal või suuremal määral mädaniku (või värvimuutuse) teket. Visuaalsel vaatlusel ilmneb see erinevates mõõtmetes nekrootiliste laikudena seemikute tüvedel. Hariliku saare leherootsude analüüsimisel määrati saaresurma tekitajaks uus invasiivne liik *Hymenoscyphus pseudoalbidus* (anamorf *C. fraxinea*).

Nulu erinevatelt liikidelt kogutud juurdekasvuproovidest kasvas juurepessu koniide välja ühel juhul, mida liigini ei määratud. Nulu kahjustuste (juurepess?) uuringuid jätkatakse kindlasti ka tulevikus.

Kasutatud kirjandus

Braze, N.J., Wick, R.L. 2011. Armillaria species distribution and site relationships in Pinus- and Tsuga-dominated forests in Massachusetts, Can. J. For. Res., 41, 1477-1490.

Cruickshank, M. 2000. Volume loss of Douglas-fir infected with *Armillaria ostoyae*. pp. 127-129 In: Hellstedt, C.; Sutherland, K.; Innes, T., eds. Proceedings, From science to management and back: a science forum for southern interior ecosystems of British Columbia. Kamloops, BC: Southern Interior Forest Extension and Research Partnership.

Drenkhan, T., Drenkhan, R., Hanso, M. 2012. Sauresurma tekitaja on hoopis teine invasiivne kottseen. – Eesti Loodus 63 (10): 41-43.

Drenkhan, R., Hanso, M. 2009a. Hariliku saare allakäik Eestis ja mujal Euroopas. – Eesti Loodus 60 (3): 14–19.

Drenkhan, R., Hanso, M. 2009b. Sauresurma tekitaja suguline arengujärk on leitud. – Eesti Loodus 60 (4): 21.

Gerlach, J.P., Reich, P.B., Puettmann, K., Baker, T. 1997. Species, diversity, and density affect tree seedling mortality from *Armillaria* root rot, Can. J. For. Res., 27, 1509–1512.

Hanso, M., Drenkhan, R. 2007. Metsa- ja linnapuud ilmastiku äärmuste vaevas. – Eesti Loodus, 58: 6–13.

Hanso, M., Hanso, S. 1992. Juurepessu (*Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref.) antagonistide otsing II.: Metsanduslikud uurimused 25, 124-142.

Hanso, M., Hanso, S. 1999a. Andmeid juuremädanike tekitajate kohta Eesti metsades.: Metsanduslikud uurimused XXXI, 141-161.

Hanso, S., Hanso, M. 1999b. Juurepessu levimisest Eesti metsades.: Metsanduslikud uurimused XXXI, 161-172.

Hanso, M., Hanso, S. 1985. Juurepessu (*Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref.) antagonistide otsing.: Metsanduslikud uurimused 20, 122-152.

Jürgenstein, Siiri 2011. Hariliku saare (*Fraxinus excelsior* L.) hukkumise põhjuste analüüs Eestis. Magistritöö metsamajanduse erialal. Eesti maaülikool, metsandus- ja maaehitusinstituut.

Klopfenstein, Ned B.; Kim, Mee-Sook; Hanna, John W.; Richardson, Bryce A.; Lundquist, John E. 2009. Approaches to predicting potential impacts of climate change on

forest disease: an example with *Armillaria* root disease. Res. Pap. RMRS-RP-76. Fort Collins, CO: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station. 10 p.

Korhonen, K., Lipponen, K., Bendz, M., Johansson, M., Ryen, I., Venn, K., Seiskari, P., Niemi, M. 1994. Control of *Heterobasidion annosum* by stump treatment with Rotstop, a new commercial formulation of *Phlebiopsis gigantea*. In: Johansson, M., Stenlid, J. (editors), Proceedings of the Eighth IUFRO Conference on Root and Butt Rots, Aug. 1993. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, 675-685.

Kowalski, T., Holdenrieder, O. 2009. The teleomorph of *Chalara fraxinea*, the causal agent of ash dieback. – Forest Pathology 39: 304–308.

Kowalski, T.; Holdenrieder, O. 2008. A new fungal disease of ash in Europe (in German). Schweiz. Z. Forstwes. 159, 45–50.

Mgbeahuruike, A.C., Sun, H., Fransson, P., Kasanen, R., Daniel, G., Karlsson, M., Asiegbu, F.O. 2011. Screening of *Phlebiopsis gigantea* isolates for traits associated with biocontrol of the conifer pathogen *Heterobasidion annosum*. - Biological Control 57 (2011) 118–129.

Piri, T. 1996. The spreading of the S type *Heterobasidion annosum* from Norway spruce stumps to the subsequent tree stand.: European Journal of Forest Pathology, 26, 193–204.

Rytkönen, A., Lilja, A., Drenkhan, R., T. Gaitnieks, T., Hantula, J. 2011. First record of *Chalara fraxinea* in Finland and genetic variation among samples from Åland, mainland Finland, Estonia and Latvia. – Forest Pathology 41: 169–174.

Stenlid, J. 1994. Homocaryotic *Heterobasidion annosum* mycelia in stumps of Norway Spruce. In: Johansson, M., Stenlid, J. (editors), proceedings of the Eighth IUFRO Conference on Root and Butt Rots, Aug. 1993. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, p. 249-253.

Swedjemark, G., Stenlid, J. 1993. Population dynamics of the root rot fungus *Heterobasidion annosum* following thinning of *Picea abies*.: Oikos, 66, 247-154.

Stenlid, J., Oliva, J., Boberg, J., Hopkins, A. 2011. Emerging diseases in European forest ecosystems and responses in society. Forests 2:486-504.

Tamm, T. 2002. Külmaseente (*Armillaria* spp.) uurimine viljakehade ja puhaskultuuride tasemel. Lõputöö. EPMÜ, Metsandusteaduskond, metsakasvatuse instituut, 98 lk.

Queloz, V., Grünig, C.R., Berndtz, R., Kowalski, T., Sieber, N., Holdenrieder, O. 2011. Cryptic speciation in *Hymenoscyphus albidus*. – Forest Pathology 41 (2): 133–142.

Woodward, S., Stenlid, J., Karjalainen, R., Hüttermann, A. (editors). 1998. *Heterobasidion annosum*: Biology, Ecology, Impact and Control. CAB International, Cambridge, 608 pp.

Lisa 1. Seemikute mõõtmis tulemused 4 kuud (Rõka) ja 5 kuud (Aimla) peale nakatamist

Järvselja, Rõka				Viljandimaa, Aimla			
puu numbrid	patogeen	kahjusutuse kirjeldus seemikutel	kahjustuse pikkus (cm)	patogeen	kahjusutuse kirjeldus seemikutel	kahjustuse pikkus (cm)	kahjustuse laius (cm)
1	Chalara fraxinea	nekrootiline laik	4	Chalara fraxinea	latv kuiv/söödud	12	0,5
2	Chalara	laik näha, ei saa mõõta, võrse tipp kuivanud		Chalara	laik kuiv, kaasa		
3	Chalara	võrse tipp surnud, ei saa mõõta		Chalara		12	1
4	Chalara	nekrootiline laik	5	Chalara		4	1
5	Chalara	hele laik lõike kohal, tipu kuivamise kahtlus	2	Chalara		9	1
6	Chalara	hele laik lõike kohal, tipu kuivamise kahtlus	2	Chalara	latv söödud, surnud	4	0,5
7	Chalara	hele laik lõike kohal	2	Chalara		3,5	0,7
8	Chalara	hele laik, ka looduslikult nakatunud Chalaraga, võeti kaasa	1	Chalara		6,5	0,6
9	Chalara	hele laik	3	Chalara		1	0,4
10	Chalara	hele laik	4	Chalara	ebaõnnestunud (lõige näha, aga pole toiminud)	4	
11	Chalara	hele laik, võeti kaasa	4	Chalara		2,5	0,4

12	Chalara	hele laik, võeti kaasa	3	Chalara		19	0,7
1	Diplodia mutila	nekrootiline laik	2	Diplodia mutila		3	0,5
2	Diplodia mutila	nekrootiline laik, kaasa võetud	1,5	Diplodia mutila		2	0,5
3	Diplodia mutila	nekrootiline laik	2	Diplodia mutila		2	0,4
4	Diplodia mutila	nekrootiline laik	1,5-3	Diplodia mutila		5	0,6
5	Diplodia mutila	nekrootiline laik (kileta), kaasa võetud	3	Diplodia mutila		2	0,4
6	Diplodia mutila	nekrootiline laik	3	Diplodia mutila	kuiv, kaasa (pole toiminud)	3	
7	Diplodia mutila	nekrootiline laik	2	Diplodia mutila		1,5	0,5
8	Diplodia mutila	nekrootiline laik	1	Diplodia mutila		1	0,5
9	Diplodia mutila	nekrootiline laik	2,5	Diplodia mutila		2	0,5
10	Diplodia mutila	nekrootiline laik	2	Diplodia mutila		1	0,5
11	Diplodia mutila	nekrootiline laik	1	Diplodia mutila		1	0,5
12	Diplodia mutila	nekrootiline laik (kaasa võetud)	1,5	Diplodia mutila		1,5	0,5
1	kontroll	ei ole laiku, võrse tipp surnud (kaasa)		kontroll	kahjustust pole (lõige???), kuid latv surnud		
2	kontroll	terve, ka võrse tipp		kontroll	latv surnud	1,5	0,5
3	kontroll	terve		kontroll	terve	1	0,5
4	kontroll	kahtlane (kaasa)		kontroll	latv surnud		
5	kontroll	terve		kontroll	latv surnud, kaasa		
6	kontroll	terve					
7	kontroll	terve					
8	kontroll	kahtlane (kaasa)					

9	kontroll	võrse tipp nakkusega					
10	kontroll	tipp surnud, lõikel pole laiku näha					