

# PATOGENOST IZOLATOV IZBRANIH VRST GLIV NA *Pinus sylvestris* L. IN *P. nigra* Arnold

## PATHOGENICITY OF SELECTED FUNGAL SPECIES ISOLATES ON *Pinus sylvestris* L. AND *P. nigra* Arnold

Ana BRGLEZ<sup>1</sup>, Barbara PIŠKUR<sup>2</sup>, Nikica OGRIS<sup>3</sup>

(1) Gozdarski inštitut Slovenije, Oddelek za varstvo gozdov, ana.brglez@gozdis.si

(2) Gozdarski inštitut Slovenije, Oddelek za varstvo gozdov, barbara.piskur@gozdis.si

(2) Gozdarski inštitut Slovenije, Oddelek za varstvo gozdov, nikica.ogris@gozdis.si

### IZVLEČEK

Na sadikah rdečega in črnega bora smo testirali patogenost osmih izbranih izolatov gliv (*Corinectria fuckeliana*, *Diaporthe eres*, *Diplodia pinea*, *Fusarium* sp. 1 in 2, *Fusicolla* sp., *Nectria dematiosa* in *Tympanis* sp.), ki smo jih izolirali iz obolelih borovih dreves v Sloveniji v letih 2020 in 2021. Inokulirali smo skupno 115 sadik borov (vključno s kontrolo), periodično smo preverjali njihovo zdravstveno stanje in ob prvih znakih sušenja opravili reizolacije iz robov nastalih nekroz. Reizolacije so bile uspešne le v primeru inokulacije z vrstami gliv *Diplodia pinea*, *Diaporthe eres* in *Fusarium* sp. 2. Povprečna dolžina nekroz sadik rdečega bora, inokuliranih z *D. pinea*, *Di. eres* in *Tympanis* sp., se je statistično značilno razlikovala od kontrolnih sadik ( $p < 0,05$ ). Pri sadikah črnega bora pa so se za statistično značilne izkazale povprečne dolžine nekroz pri kontroli in inokulacijah z glivama *D. pinea* in *Tympanis* sp. ( $p < 0,05$ ).

**Ključne besede:** test patogenosti, reizolacije, *Pinus sylvestris*, rdeči bor, *Pinus nigra*, črni bor

### ABSTRACT

The pathogenicity of eight selected fungal isolates (*Corinectria fuckeliana*, *Diaporthe eres*, *Diplodia pinea*, *Fusarium* sp. 1 and 2, *Fusicolla* sp., *Nectria dematiosa* and *Tympanis* sp.), isolated from diseased pines in Slovenia in 2020 and 2021, was tested on seedlings of Scots and Austrian pine. We inoculated a total of 115 pine seedlings (including the control group), regularly checked their health status and performed re-isolations from necrotic margins at the first signs of desiccation. Re-isolations were successful only when inoculated with *Diplodia pinea*, *Diaporthe eres* and *Fusarium* sp. 2. The average length of necrosis in Scots pine seedlings inoculated with *D. pinea*, *Di. eres* and *Tympanis* sp. was significantly different from that of the control group ( $p < 0.05$ ). In Austrian pine seedlings, the average length of necrosis differed significantly between the control group and seedlings inoculated with the fungi *D. pinea* and *Tympanis* sp. ( $p < 0.05$ ).

**Key words:** pathogenicity test, re-isolations, *Pinus sylvestris*, Scots pine, *Pinus nigra*, Austrian pine

GDK 443.2:174.7Pinus(045)=163.6

DOI 10.20315/ASetL.132.1

Prispelo / Received: 21. 07. 2023

Sprejeto / Accepted: 07. 09. 2023



## 1 UVOD

### 1 INTRODUCTION

Bor (*Pinus* spp.) je vrstno najbogatejši rod iglavcev na svetu, skupaj je znanih okrog 100 vrst (Farjon in Styles, 1998). V Evropi avtohtono raste 10 vrst, v Sloveniji pa štiri: rdeči bor (*P. sylvestris* L.), črni bor (*P. nigra* Arnold), rušje (*P. mugo* Turra) in cemprin (*P. cembra* L.) (Brus, 2008). V Evropi je rdeči bor najbolj razširjen iglavec. Na revnih in degradiranih rastiščih opravlja pomembno melioracijsko vlogo (Brus, 2008). V letu 2021 je lesna zaloga borov znašala 5,4 % skupne lesne zaloge slovenskih gozdov (Gozdni fondi, b. l.).

Najpomembnejše vrste gliv, ki povzročajo bolezní borov pri nas, so: *Cenangium ferruginosum* Fr. (sušica borovih vej), *Corinectria fuckeliana* (C. Booth) C.D.

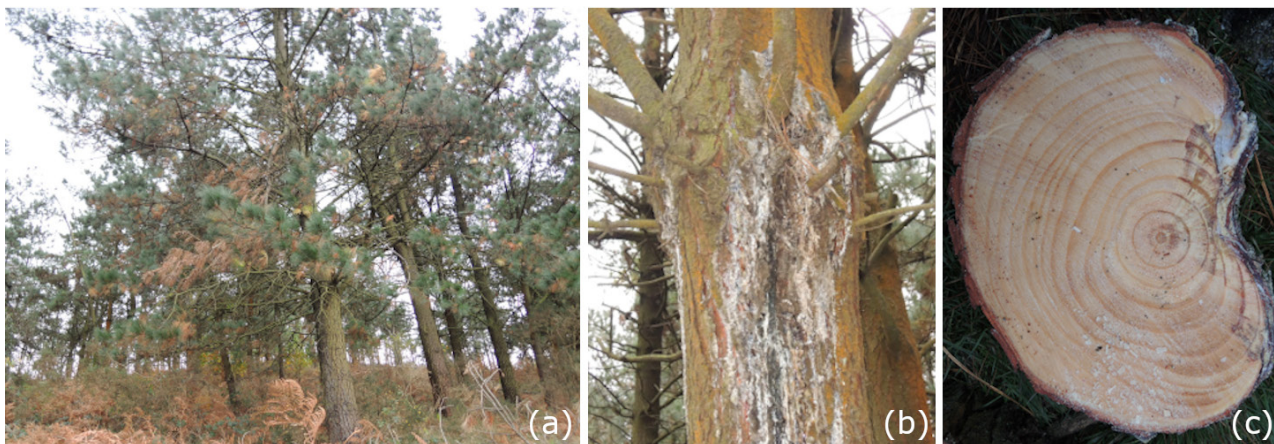
González & P. Chaverri (sušica vej iglavcev), *Cyclaneusma minus* (Butin) DiCosmo, Peredo & Minter (rume- ni osip borovih iglic), *Diplodia pinea* (Desm.) J. Kickx f. (sušica najmlajših borovih poganjkov), *Dothistroma* spp. Hulbary (rdeča pegavost borovih iglic), *Gremmeniella abietina* (Lagerb.) M. Morelet (odmiranje poganjkov črnega bora), *Lecanosticta acicola* (Thüm.) Syd. (rjavenje borovih iglic), *Lophodermium seditiosum* Minter, Staley & Millar (osip borovih iglic), *Meloderma desmazieri* (Duby) Darker (osip iglic zelenega bora) in nekatere rje (Maček, 2008). Med škodljivimi žuželkami na borih pa pri nas prevladujejo vrste iz družine podlubnikov (Scolytidae), navadna in rjava borova grizlica (*Diprion pini* Linnaeus in *Neodiprion sertifer* Geoffroy), vrste iz družine zapredkaric (*Acantholyda hieroglyphi-*

ca Christ, *A. nemoralis* Thomson, *A. erythrocephala* Linnaeus), zavijač borovih poganjkov (*Rhyacionia buoliana* Denis & Schiffermüller) ipd. (Jurc, 2011).

Poleg že ustaljenih škodljivih organizmov pa se lahko k nam razširijo tudi novi, za zdaj na območju Slovenije neznani organizmi. Na karantenskih listah EU (Izvedbena uredba komisije..., 2019) se pojavlja več vrst gliv in žuželk, ki pomenijo tveganje za bore v Evropi. V Sloveniji smo do sedaj z rednimi letnimi programi preiskav ugotavljali njihovo navzočnost (npr. *Atropellis* spp., *Bursaphelenchus xylophilus* / Steiner et Bühner / Nickle et al., *Cronartium* spp., razen *Cronartium gentianeum*, *Cronartium pini* / Willdenow / Jørstad in *Cronartium ribicola* Fischer, *Dendrolimus sibiricus* Chetverikov, *Monochamus* spp. (neevropske populacije), *Pissodes* spp. (neevropske populacije)), a iskanih organizmov v Sloveniji nismo našli. Eden takšnih je tudi gliva *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell, ki povzroča borov smolasti rak (angl. pine pitch canker). Gre za bolezen borov z značilnimi nekrozami na deblu, vejah in koreninah ter obilnim smoljenjem (Pest survey ..., 2020; *Fusarium circinatum*, 2022b) (slika 1). Domneva se, da vrsta izvira iz Mehike (Wikler in Gordon, 2000), od koder se je najverjetneje razširila po Severni Ameriki in drugih delih sveta (Japonska, Južna Koreja, Južna Afrika, Brazilija, Čile, Kolumbija, Urugvaj) (*Fusarium circinatum*, 2022a). Leta 2003 so jo prvič zasledili v Španiji (Landeras in sod., 2005), kasneje tudi na Portugalskem (Bragança in sod., 2009), v Franciji (First report ..., 2006) in Italiji (Carlucci in sod., 2007). Bolezen so uspešno zatrli v Franciji in Italiji, v Španiji in na Portugalskem pa se še vedno pojavlja in širi. Bolezen se na kratkih razdaljah širi s pomočjo vetra in žuželk, na daljših razdaljah pa s transportom okuženega semena, sadik, lesa, zemlje, lubja ipd. (Pest survey ..., 2020). V preglednem članku Drenkhan in sod. (2020)

navajajo 106 gostiteljskih vrst, od tega 85 vrst iz rodu *Pinus*, 6 drugih drevesnih vrst in 15 vrst trav in zelišč. Glavna gostitelja sta bor (*Pinus* spp. L.) in navadna ameriška duglazija (*Pseudotsuga menziesii* /Mirbel/ Franco). Možnosti za vnos in širjenje glive v Evropi in pri nas so zaradi ugodnih klimatskih razmer in razširjenosti gostiteljskih dreves razmeroma velike (Ganley in sod., 2009; Möykkynen in sod., 2015; Ogris, 2017).

*Fusarium circinatum* je v okviru Evropske unije uvrščen kot karantenski škodljivi organizem v Prilogo II.B Uredbe 2019/2072/EU (Izvedbena uredba komisije ..., 2019), poleg tega pa je bil leta 2019 sprejet Izvedbeni sklep komisije (EU) 2019/2032 (Izvedbeni sklep komisije ..., 2019), s katerim so države članice EU obvezane k letnim pregledom za ugotavljanje navzočnosti omenjene glive. Programe preiskav za ugotavljanje navzočnosti škodljivih organizmov rastlin uresničuje Uprava Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin s pomočjo pooblaščenih javnih zavodov in Inšpekcije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin (Programi preiskav ..., 2022) in vključujejo vizualne preglede, vzorčenje simptomatskih rastlin ter ugotavljanje navzočnosti glive na potencialnih vektorjih, ki jih lovimo s pastmi. Gozdarski inštitut Slovenije je vključen v vsakoletni program preiskav za ugotavljanje navzočnosti karantenske glive *F. circinatum*, a omenjene glive do zdaj v Sloveniji še nismo zaznali (Programi preiskav ..., 2022). Iz gostiteljskih rastlin, ki kažejo podobna znamenja poškodovanosti ali okužb z glivo *F. circinatum*, pogosto med analizami vzorcev izoliramo številne druge glive, ki so potencialno patogene in lahko povzročijo podobna bolezenska znamenja kot *F. circinatum*. Za ugotavljanje vpliva izoliranih vrst gliv na zdravstveno stanje borov (*Pinus* spp.) smo v naši raziskavi ugotavljali patogenost izbranih izolatov gliv na sadikah rdečega in črnega bora.



**Slika 1:** Značilna bolezenska znamenja borovega smolastega raka: a) odmiranje poganjkov in vej, b) rakava rana na deblu, ki obilno smoli, in c) s smolo prepojeni les (foto: Nikica Ogris)

**Fig. 1:** Typical symptoms of pine canker disease: a) dieback of shoots and branches, b) copious resin exudates (pitch) beneath cankers, and c) resin-soaked wood (Photo: Nikica Ogris)

Preglednica 1: Izolati gliv, uporabljeni v poskusu

Table 1: Fungal isolates used in the study

Vrste	ZLVG <sup>1</sup>	GenBank <sup>2</sup>		Lokacija <sup>3</sup>	Gostitelj
<i>Corinectria fuckeliana</i> (C. Booth) C.D. González & P. Chaverri	911	ITS EF-1 $\alpha$ LSU	OR077711 OR105860 OR077743	X: 437383 Y: 76576 (Strmica)	<i>P. sylvestris</i>
<i>Diaporthe eres</i> Nitschke	987	ITS BT EF-1 $\alpha$	OR077715 OR098303 OR122685	X: 436884 Y: 66882 (Matenja vas)	<i>P. wallichiana</i>
<i>Diplodia pinea</i> (Desm.) J. Kickx f.	900	ITS EF-1 $\alpha$	OR077709 OR105859	X: 390462 Y: 80296 (Opatje selo)	<i>P. pinea</i>
<i>Fusarium</i> sp. 1 Link	982	ITS EF-1 $\alpha$ rpb2	OR077708 OR105858 OR098304	X: 552238 Y: 78337 (Grad Mokrice)	<i>P. strobis</i>
<i>Fusarium</i> sp. 2 Link	985	ITS EF-1 $\alpha$ rpb2	OR077713 OR105857 OR098305	X: 440126 Y: 86607 (Logatec)	<i>P. wallichiana</i>
<i>Fusicolla</i> sp. Bonord	984	ITS EF-1 $\alpha$ rpb2	OR077712 OR105856 OR098306	X: 440126 Y: 86607 (Logatec)	<i>P. wallichiana</i>
<i>Nectria dematiosa</i> (Schwein.) Berk.	965	ITS EF-1 $\alpha$ LSU	OR077714 OR105861 OR077744	X: 459060 Y: 59883 (Snežnik)	<i>P. wallichiana</i>
<i>Tympanis</i> sp. Tode	983	ITS LSU	OR077710 OR077742	X: 490100 Y: 56942 (Kočevje)	<i>P. sylvestris</i>

<sup>1</sup> Številka izolata v zbirki trajnih kultur Laboratorija za varstvo gozdov

<sup>2</sup> Številke nukleotidnih zaporedij različnih regij DNA v bazi GenBank

<sup>3</sup> Koordinate so v D48 koordinatnem sistemu

## 2 METODE

### 2 METHODS

#### 2.1 Izolati gliv

##### 2.1 Fungal isolates

Za poskus smo izbrali izolate osmih vrst gliv, ki smo jih pridobili med programom preiskav za ugotavljanje navzočnosti patogene glive *Fusarium circinatum* v letih 2020 in 2021. Bori (*Pinus* spp.), ki so bili vključeni v vzorčenje, so izražali venenje, odmiranje poganjkov, rakaste razjede na deblu in vejah, izcejanje smole iz prizadetih delov. Izolati so bili izolirani iz rastlinskega materiala, in sicer iz roba nekroz borov (*Pinus* spp.). Odstranili smo zunanji del suberizirane skorje, iz roba nekroze s sterilnim skalpelom izrezali trak skorje z lesom velikosti približno 10 × 2 mm<sup>2</sup> in na sterilnem filter-papirju pripravljeni trak razrezali na manjše koščke velikosti približno 2 × 2 mm<sup>2</sup>. V sterilno plastično petrijevko ( $\varnothing = 70$  mm) s hranilnim agarjem PDA (angl. potato dextrose agar; slo. krompirjev dekstrozni agar; Becton Dickinson, Sparks, MD, ZDA), pripravljenim po navodilih proizvajalca (39 g PDA raztopljenih v 1 l destilirane vode ter sterilizacija pri 121 °C in 1,2 bara) z dodatkom antibiotika streptomycin (0,5 g anti-

biotika dodanega v sterilizirano gojišče, ohlajeno na 60 °C), smo vstavili štiri koščke. Med inkubacijo na 24 °C v temi smo petrijevke večkrat preverili in v mikrobiološki komori aseptično precepili vse izraščajoče vrste gliv na sveže gojišče PDA. Izbrani izolati so bili do nivoja vrste ali rodu določeni na podlagi primerjav več regij DNA z referenčnimi nukleotidnimi zaporedji in z javno dostopnimi bazami GenBank (b. l.), BOLD (b. l.) oziroma FUSARIOID-ID (b. l.) (preglednica 1).

#### 2.2 Test patogenosti

##### 2.2 Pathogenicity test

V drevesnici Gozdarskega inštituta Slovenije pri Šentjakobu ob Savi (X: 467.968 m, Y: 104.607 m) smo aprila 2022 posadili skupno 126 triletnih sadik rdečega in črnega bora. Sadike rdečega bora so bile vzgojene iz semena, ki je bil pridobljen v semenskem sestoju z reg. št. 4.0253 (Udin Boršt) in glavnim spričevalom SI 05-006, črni bor pa v semenskem sestoju z reg. št. 7.0289 (Čebulovica) in glavnim spričevalom SI 09-023. Mesec dni kasneje smo vizualno zdrave in nepoškodovane sadike (119) inokulirali z izbranimi izolati gliv (preglednica 1). Debelca smo najprej površinsko raz-

**Preglednica 2:** Število sadik rdečega in črnega bora, ki smo jih inokulirali z izbranimi izolati gliv

	<i>Pinus sylvestris</i>	<i>Pinus nigra</i>
<i>Corinectria fuckeliana</i>	7	7
<i>Diaporthe eres</i>	7	6
<i>Diplodia pinea</i>	6	7
<i>Fusarium</i> sp. 1	6	7
<i>Fusarium</i> sp. 2	6	7
<i>Fusicolla</i> sp.	6	7
<i>Nectria dematiosa</i>	6	7
<i>Tympanis</i> sp.	7	7
Kontrola	6	7

**Table 2:** Number of *P. sylvestris* and *P. nigra* seedlings inoculated with selected fungal isolates

kužili s 70 % etanolom. Na sredini očiščenega dela debelca smo skorjo ranili s sterilnim luknjačem za usnje ( $\varnothing = 4$  mm) in v rano vstavili košček agarja z micelijem z roba aktivno rastočih, 10 dni starih kultur izbranih gliv (na gojišču PDA pri 24 °C). Inokulacijski košček smo prekrili z vlažno sterilno vato (velikosti približno  $1 \times 1$  cm<sup>2</sup>) ter mesto inokulacije tesno ovili z alufolijo in parafilmom. Z vsako izbrano glivo smo inokulirali najmanj šest sadik rdečega in najmanj šest sadik črnega bora. Šest sadik rdečega in sedem sadik črnega bora, ki smo jim v rano vstavili košček sterilnega agarja, je rabilo za kontrolo. Število inokuliranih sadik se je med obravnavanji razlikovalo (preglednica 2), saj se je do inokulacije nekaj sadik posušilo ali pa so bile poškodovane, zato smo jih izločili iz poskusa.

Zdravstveno stanje inokuliranih sadik smo periodično (na 14 dni) preverjali in ob začetnih znamenjih sušenja smo poskus, ki je vključeval sadike, inokulirane z isto vrsto glive, zaključili in opravili reizolacije. Po 49 dneh od inokulacij smo zaključili poskus z glivo *D. pinea*, po 60 dneh z glivama *Fusarium* sp. 1 in *Fusarium* sp. 2, po 103 dneh z glivami *C. fuckeliana*, *Tympanis* sp. in kontrolo ter po 105 dneh z glivami *Di. eres*, *Fusicolla* sp. in *N. dematiosa*. Sadike smo izruvali s koreninskim

sistemom vred in jih prepeljali v Laboratorij za varstvo gozdov na Gozdarskem inštitut Slovenije. Debelca inokuliranih in kontrolnih sadik smo v laboratoriju najprej površinsko razkužili. S kuhinjsko gobico smo pod tekočo vodo odstranili zemljo in druge nečistoče. Nato smo debelca za eno minuto potopili v 70 % etanol, za 30 s v komercialno Varikino z 1 % aktivnega klora, ponovno za minuto v 70 % etanol in jih na koncu sprali v sterilni destilirani vodi. S sterilnim skalpelom smo vzorcem najprej odstranili periderm (zunani del skorje), da smo identificirali rob nekroze. Dolžino vidne nekroze smo merili z navadnim plastičnim ravnilom (slika 2) in iz njenega roba odvzeli po 8 (v primeru suhe sadike) oz. 16 (v primeru žive sadike) koščkov lesa približne velikosti  $2 \times 2$  mm<sup>2</sup> ter jih nacepili na 3,9 % (m/V) PDA-gojišče z dodatkom 0,05 % (m/V) antibiotika streptomycin. Petrijevke s po štirimi koščki lesa smo inkubirali v temi v inkubatorju pri temperaturi 24 °C in periodično (3x tedensko) preverjali rast ter precepljali kulture na sveže gojišče PDA. Dobljene čiste kulture gliv smo na podlagi vizualnih makromorfoloških značilnosti (npr. barva in oblika kulture, tip micelija, oblika roba kulture, barva na hrbtni strani petrijevke) razvrstili v morfotipe. V poskusu smo po reizolacijah pridobili

**Slika 2:** Prikaz dolžine nekroze (razdalja med rdečima črtama)**Fig. 2:** Display of necrosis length (distance between the red lines)

**Preglednica 3:** Uporabljene kombinacije začetnih oligonukleotidov in pogoji reakcij PCR

Regija	Začetni oligonukleotidi	T naleganja (°C)	Reference
ITS rDNA	ITS1 / ITS4	55	(White in sod., 1990)
EF-1 $\alpha$	EF1-728f / EF1-1567	66 (9x) in 56 (35x)	(Hirooka in sod., 2012)
EF-1 $\alpha$	EF1f / EF1r	55	(PM 7/91 ..., 2019)
LSU	LR0R / LR5	53	(Vilgalys in Hester, 1990)
$\beta$ -tubulin	BT2a / BT2b	60	(Gomes in sod., 2013)
rpb2	RPB2-5f2 / RPB2-7cr in RPB2-7cf / RPB2-11ar	55	(Crous in sod., 2021)

30 morfotipov, za nadaljnjo identifikacijo smo izbrali 14 morfotipov, ki so bili najpogostejši, oziroma morfotipe, ki so bili podobni glivam, ki smo jih uporabili za inokulacijo. Za molekularno določanje smo izbrali eno reprezentativno kulturo posameznega morfotipa. Reprezentativne kulture so shranjene v zbirki trajnih kultur Laboratorija za varstvo gozdov na Gozdarskem inštitutu Slovenije.

### 2.3 DNA ekstrakcija, pomnoževanje in sekvenciranje

### 2.3 DNA extraction, amplification and sequencing

Za namen identifikacije izolatov smo uporabili identifikacijo na podlagi molekularnih podatkov. Iz micelija, postrganega iz gojišča PDA, smo izolirali celokupno DNA glive s komercialnim ekstrakcijskim kitom Nucleospin Plant II (Macherey Nagel, Düren, Nemčija). Ekstrakcijo smo opravili po navodilih proizvajalca, le da smo za homogenizacijo glivnega materiala uporabili tubice Lysing Matrix A (MP Biomedicals, Solon, OH, ZDA) in homogenizator Precellys Evolution (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, Francija). Za pomnoževanje izbranih regij DNA smo uporabili kombinacije začetnih oligonukleotidov in pogojev, kot so opredeljeni v preglednici 3. Dobljene PCR-produkte smo v nadaljevanju očistili s pomočjo komercialnega kita Wizard SV Gel in PCR Clean-Up System (Promega, Fitchburg, WI, ZDA) po navodilih proizvajalca ter poslali na sekvenciranje v Eurofins Genomics (Köln, Nemčija). Sekvence smo vizualizirali in obdelali v programu Geneious (Biomatters Ltd., Auckland, Nova Zelandija). Konsenze sekvenc smo med 29. julijem in 3. novembrom 2022 preverjali z različnimi javno dostopnimi bazami nukleotidnih zaporedij ter primerjali s sekvencami izolatov, ki so bili uporabljeni v testu patogenosti. Sekvence smo deponirali v podatkovno zbirko GenBank.

**Table 3:** Primer oligonucleotide combinations used and PCR reaction conditions

## 2.4 Analiza podatkov

### 2.4 Data analysis

Podatke o dolžinah nekroz sadik borov smo analizirali s pomočjo programskega paketa Microsoft Excel verzija 2210 in programske opreme za statistične analize R (R Core Team, 2019). Za testiranje homogenosti varianc smo uporabili Levenov test. V nadaljevanju smo v primeru podatkov za rdeči bor s pomočjo Kruskal-Wallisovega testa primerjali povprečne dolžine nekroz pri sadikah, inokuliranih z različnimi izolati izbranih gliv. Nato smo uporabili post-hoc Dunnov test multiplih parnih primerjav. V primeru podatkov za črni bor je bila v skupini sadik, okuženih z *D. pinea*, le ena vrednost, zato smo uporabili parametrični test ANOVA in post-hoc Tukey HSD test. Iz obdelave smo namreč v obeh primerih izločili suhe sadike, kjer nismo imeli podatkov o dolžinah nekroz.

Iz podatkov o reizoliranih vrstah smo s pomočjo Microsoft Excel verzije 2210 izračunali stopnjo kolonizacije in relativne frekvence. Stopnjo kolonizacije smo izračunali kot količnik med številom okuženih koščkov (izraščajoč micelij) in skupnim številom nacepljenih koščkov. Relativna frekvenca (F) posameznega taksona je bila izračunana kot količnik med številom kultur določenega taksona in skupnim številom kultur. Določili smo tudi stopnjo propadlih sadik.

## 3 REZULTATI

### 3 RESULTS

#### 3.1 Test patogenosti

#### 3.1 Pathogenicity test

Inokulacijska mesta so se v večini primerov po koncu poskusa že zaraščala, dobro opazna je bila tudi tvorba kalusa. Kljub temu smo z robov nekroze oz. robov mest inokulacije opravili reizolacije v čiste kulture. Očitne nekroze so bile opazne samo pri sadikah, inokuliranih z *D. pinea* (slika 3c in slika 4c). Kontrolne sadike so se večinoma zaraščale, zato v teh primerih na mestih inokulacij ni bilo nekroz. Pri nekaj inokuliranih



**Slika 3:** Nekroze na sadikah rdečega bora, ki so jih povzročile glive: a) *C. fuckeliana*, b) *Di. eres*, c) *D. pinea*, d) *Fusarium* sp. 1, e) *Fusarium* sp. 2, f) *Fusicolla* sp., g) *N. dematiosa*, h) *Tympanis* sp. in i) kontrola

**Fig. 3:** Necroses on *P. sylvestris* saplings inoculated with a) *C. fuckeliana*, b) *Di. eres*, c) *D. pinea*, d) *Fusarium* sp. 1, e) *Fusarium* sp. 2, f) *Fusicolla* sp., g) *N. dematiosa*, h) *Tympanis* sp. and control

sadikah je bila opazna zadebelitev na mestu inokulacije (slika 3b).

Povprečna dolžina nekroz kontrolnih sadik rdečega bora se je statistično značilno razlikovala od dolžin nekroz sadik, inokuliranih z *D. pinea*, *Di. eres* in *Tympanis* sp. ( $p < 0,05$ ). V primeru sadik črnega bora pa so bile statistično značilne razlike v povprečni dolžini nekroz med kontrolo in sadikami, inokuliranimi z *D. pinea* in *Tympanis* sp. ( $p < 0,05$ ) (sliki 5 in 6). Najdaljšo nekrozo (63 mm) je povzročila inokulacija z glivo *D. pinea* na rdečem boru.

Suhim sadikam ob koncu poskusa nismo izmerili dolžine nekroz in jih nismo vključili v nadaljnje analize (preglednica 4).

Ponovna reizolacija gliv, s katerimi smo okužili sadike rdečega in črnega bora, je bila uspešna le v treh primerih, in sicer pri inokulaciji z *D. pinea*, *Di. eres* in *Fusarium* sp. 2. Identiteta sekvenc reizoliranih izolatov se je popolnoma (100 %) ujemala z osnovnimi sekvencami izolatov, s katerimi smo opravljali inokulacije sadik (dostopne sekvence ITS regije v bazi GenBank:

OR077709 (*D. pinea*), OR077715 (*Di. eres*), OR077713 (*Fusarium* sp. 2)).

Z roba nekroz smo sicer določili tudi številne druge vrste (slika 7). Iz 1784 nacepljenih koščkov lesa smo pridobili 1478 kultur, ki so predstavljale 30 morfotipov. Stopnja kolonizacije pri sadikah rdečega bora je znašala 88,2 %, pri sadikah črnega bora pa 77,8 %. Na sadikah rdečega bora smo identificirali 13 različnih taksonov, na sadikah črnega bora pa 16 taksonov gliv. Sekvence identificiranih taksonov so dostopne v podatkovni zbirki GenBank pod kodami: OR091293–OR091327. Reprezentativne kulture pa so shranjene v zbirki trajnih kultur Laboratorija za varstvo gozdov (ZLVG 1026–ZLVG 1038).

#### 4 RAZPRAVA IN ZAKLJUČKI

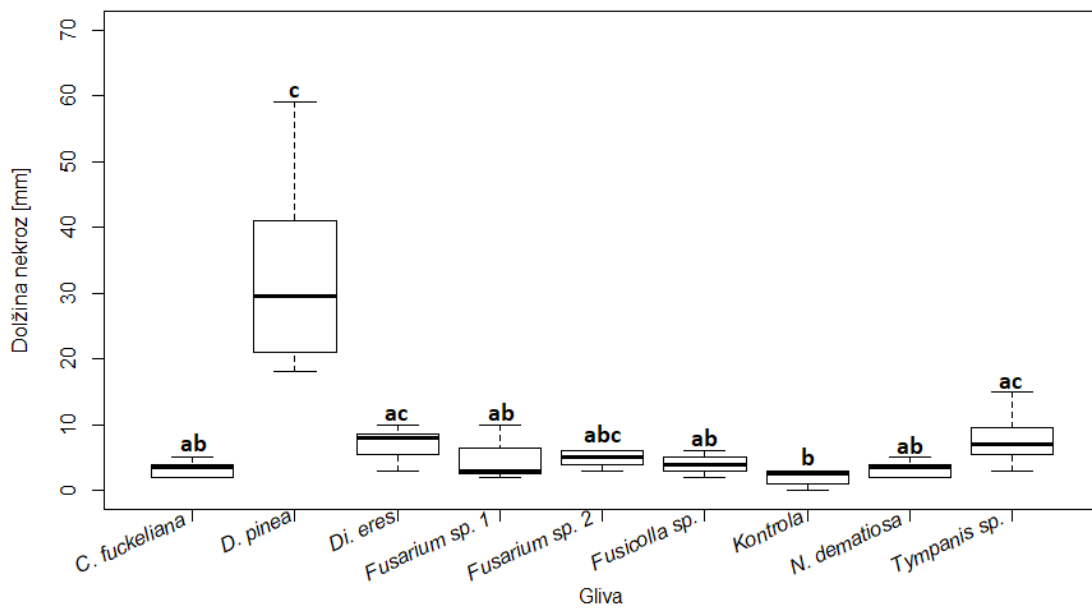
#### 4 DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Test patogenosti smo opravili na sadikah, posajenih v gredi v drevesnici Gozdarskega inštituta Slovenije. Sadike so bile izpostavljene vplivu stresnih dejavnikov – suša, obilne padavine, žuželke, drugi patogeni orga-



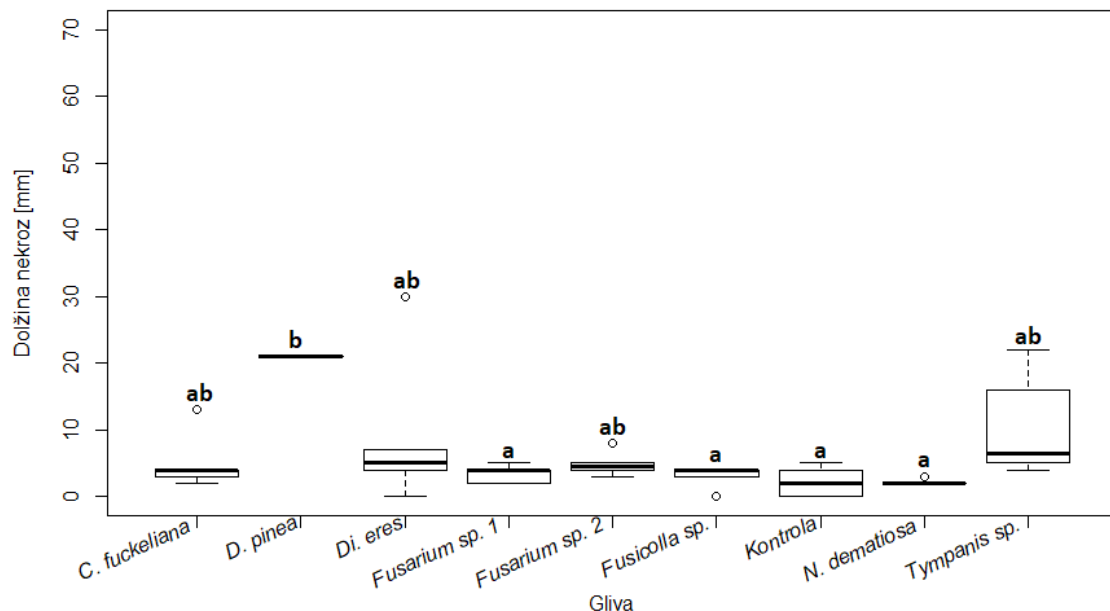
**Slika 4:** Nekroze na sadikah črnega bora, ki so jih povzročile glive: a) *C. fuckeliana*, b) *Di. eres*, c) *D. pinea*, d) *Fusarium* sp. 1, e) *Fusarium* sp. 2, f) *Fusicolla* sp., g) *N. dematiosa*, h) *Tympanis* sp. in i) kontrola

**Fig. 4:** Necroses on *P. nigra* saplings inoculated with a) *C. fuckeliana*, b) *Di. eres*, c) *D. pinea*, d) *Fusarium* sp. 1, e) *Fusarium* sp. 2, f) *Fusicolla* sp., g) *N. dematiosa*, h) *Tympanis* sp. and i) control



**Slika 5:** Dolžine nekroz sadik rdečega bora, inokuliranih z izbranimi izolati gliv ob koncu testa patogenosti. Grafikon prikazuje minimum, prvi kvartil, mediano, tretji kvartil in maksimum. Črke ponazarjajo različne statistične skupine (glede na post-hoc Dunnov test).

**Fig. 5:** Necrosis lengths of *P. sylvestris* inoculated with selected fungi at the end of the pathogenicity test. The boxplot shows the minimum, first quartile, median, third quartile and maximum values. The letters represent different statistical groups (based on post-hoc Dunn test).



**Slika 6:** Dolžine nekroz sadik črnega bora, inokuliranih z izbranimi izolati gliv ob koncu testa patogenosti. Grafikon prikazuje minimum, prvi kvartil, mediano, tretji kvartil in maksimum. Črke ponazarjajo različne statistične skupine (glede na post-hoc Tukey HSD test).

**Fig. 6:** Necrosis lengths of *P. nigra* inoculated with selected fungi at the end of the pathogenicity test. The boxplot shows the minimum, first quartile, median, third quartile and maximum values. The letters represent different statistical groups (based on post-hoc Tukey HSD test).

**Preglednica 4:** Delež propadlih sadik rdečega in črnega bora ob koncu testa patogenosti

	<i>Pinus sylvestris</i>		<i>Pinus nigra</i>	
	n <sup>a</sup>	%	n <sup>a</sup>	%
<i>Corinectria fuckeliana</i>	1	14,3		
<i>Diplodia pinea</i>			6	85,7
<i>Fusarium</i> sp. 1	2	33,3		
<i>Fusarium</i> sp. 2	1	16,7	1	14,3
<i>Nectria dematiosa</i>			1	14,3
<i>Typanis</i> sp.			1	14,3
Kontrola	2	33,3		

a – število suhih sadik ob koncu poskusa

nizmi, ki so poleg inokuliranih gliv tudi vplivali na rezultate testa patogenosti.

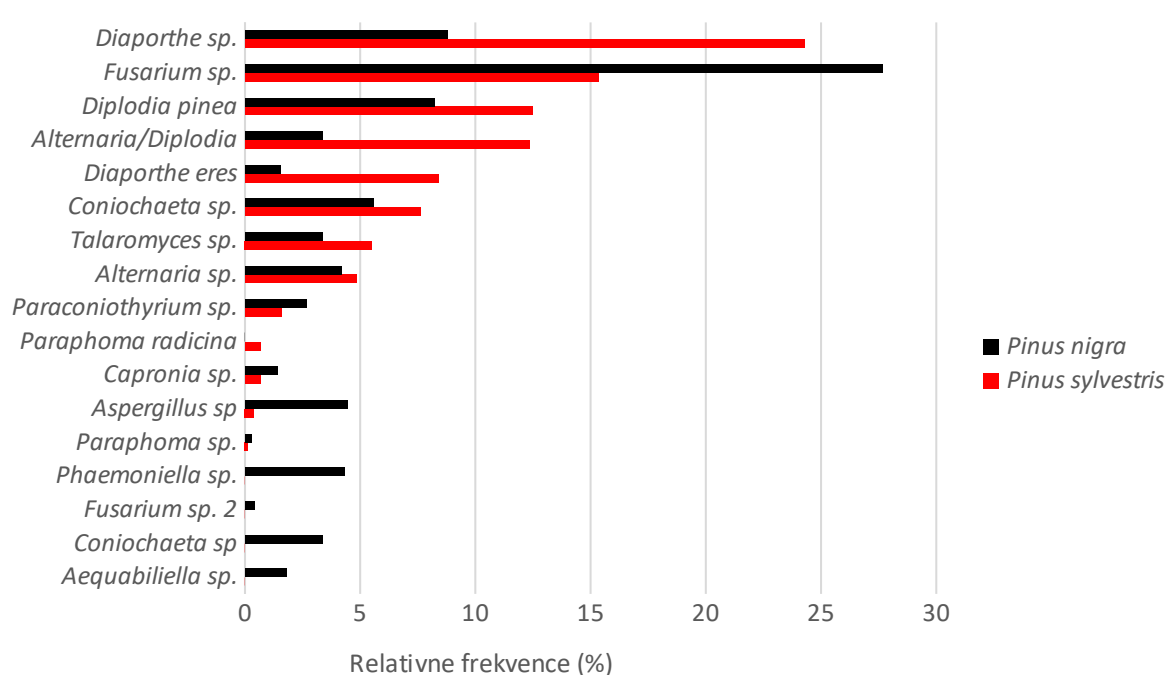
Na 4,8 % inokuliranih sadik ob koncu poskusa ni bilo vidnih nekroz, mesta inokulacije pa so bila v teh primerih skoraj v celoti zaraščena. Isti izolat je na nekaterih sadikah povzročil nekroze, na drugih pa so se rane popolnoma zaraščale. To lahko kaže, da so določeni izbrani izolati manj virulentni in na končni rezultat odločilno vplivajo drugi dejavniki, npr. predhodno zdravstveno stanje sadik, odpornost rastline, globina inokulacije, prisotnost endofitov, interakcije z drugimi vrstami in mikrolokacija. Dolžine nekroz so lahko povezane tudi z različno hitrostjo rasti posameznih gliv. Micelij določenih vrst lahko namreč raste mnogo hitre-

**Table 4:** Mortality rates of *P. sylvestris* and *P. nigra* at the end of the pathogenicity test

je od drugih in zato tudi prej povzroči tvorbo nekroz. Takšne glive imajo kasneje tudi večjo možnost za pozitivno reizolacijo (Kowalski in sod., 2017).

Inokulirane glive so, razen v primeru *D. pinea*, povzročile malo variabilne dolžine nekroz na sadikah rdečega in črnega bora. Največjo variabilnost smo opazili pri sadikah rdečega bora, okuženih z *D. pinea*, kjer je razpon dolžine nekroz znašal 41 mm.

Testirane glive imajo različne vloge v ekosistemu in so tako glede naših opažanj in literaturnih podatkov znane kot bolj ali manj patogene za bore (*Pinus* spp.). Gliva *Corinectria fuckeliana* spada v družino Nectriaceae in povzroča rake številnih iglastih in listnatih dreves (Salgado-Salazar in Crouch, 2019). *Diplodia pinea* je

**Slika 7:** Relativne frekvence izoliranih vrst gliv z roba nekroz na sadikah rdečega in črnega bora**Fig. 7:** Relative frequencies of isolated fungi from the margins of necroses on *P. sylvestris* and *P. nigra* saplings



močno razširjena gliva v srednji Evropi in povzročča odmiranje enoletnih poganjkov črnega in rdečega bora. Ob odmiranju se poganjki tudi izrazito smolijo (Maček, 2008). Trenutno je zelo aktualna v severni Evropi, kjer predvsem v stresnih razmerah gostiteljskih dreves povzročča velike škode (Brodde in sod., 2019). *Diaporthe eres* je prav tako ena izmed znanih patogenih gliv, ki z raki in nekrozami debel, odmrtnjem koreninika, odmiranjem vej, nekrozami listov in poganjkov ipd. negativno vpliva na številne gospodarsko pomembne rastline (Chaisiri in sod., 2021). Glive iz rodu *Fusarium* so ena izmed najpomembnejših skupin rastlinskih patogenov in so zato tudi predmet številnih raziskav. Trenutno je znanih več kot 300 vrst, ki jih delimo v 23 vrstnih kompleksov (Jacobs-Venter in sod., 2018). Šele Gräfenhan in sod. (2011) so nekaj predstavnikov vrstnega kompleksa *F. aquaeducuum* in *F. merismoides* uvrstili v samostojen rod *Fusicolla*. Rod *Nectria* je rod gliv, ki jih pogosto najdemo v zmernem podnebju severne poloble. Povezujejo jih z odmiranjem in raki številnih lesnatih rastlin. Vrsto *Nectria dematiosa*, ki smo jo uporabili v našem poskusu, so v preteklosti razumeli kot sinonim za *N. cinnabarina*, povzročiteljico rdeče sušice listavcev (Hirooka in sod., 2011). Vrste iz rodu *Tympanis* sp. pa med drugim povezujejo z raki na deblih različnih vrst borov (Groves in Leach, 1949).

Vendar pa razlike v patogenosti testiranih gliv na borovih sadikah v našem poskusu niso bile najbolj očitne. Največjo patogenost je v primeru rdečega in črnega bora izražal izolat glive *D. pinea*. V primeru rdečega bora sta se za značilno virulentnejši od kontrole izkazali še *Di. eres* in *Tympanis* sp., v primeru črnega bora pa le *Tympanis* sp. Patogenost drugih izbranih vrst gliv se ni statistično značilno razlikovala od kontrole. Reizolacije gliv smo opravili ob prvih znamenjih sušenja sadik. Sklepamo, da smo poskus prehitro zaključili, saj smo domnevali, da se sadike sušijo zaradi delovanja inokuliranih gliv. Ker je bilo število inokuliranih sadik na izolat glive relativno majhno (6–7), nismo mogli poskusno preveriti pri eni ali dveh sadikah, kakšno je dejansko stanje, saj bi s tem izgubili prevelik delež sadik. Kasneje se je izkazalo, da so se zaradi delovanja inokuliranih gliv sušile le sadike inokulirane z glivo *D. pinea*. Druge pa so se najverjetneje sušile zaradi sušnega stresa in že prisotnih endofitov, kot na primer *Diplodia* sp., *Diaporthe* sp., *Fusarium* sp. idr. Predvidevamo, da bi ob podaljšanju poskusa dobili drugačne rezultate in bi bile tudi reizolacije inokuliranih gliv bolj uspešne.

V naravi so okužbe z izbranimi glivami precej kompleksne. Najpomembnejše so interakcije med patogenom in endofiti, ki vplivajo na okužbo in odziv nanjo (Kowalski in sod., 2017). Tudi uspeh relativno močno

patogenih gliv je odvisen od oslabelosti gostitelja. V današnjih razmerah, ob upoštevanju globalnega segrevanja in spreminjajočih se padavinskih režimov, lahko pričakujemo tudi spremembe v habitatih, življenjskih ciklih in rasti gliv, kar lahko v določenih primerih poveča ali zmanjša njihovo patogenost (Gross in sod., 2014). V poskusu smo poskušali čim bolj posnemati procese v naravi in s tem pridobiti čim bolj realen vpogled v delovanje izbranih gliv. Zanimivo bi bilo preveriti tudi različne kombinacije gliv, ker morda delujejo v sinergiji in šele v primeru skupne okužbe povzročijo večje poškodbe oz. nekroze.

## 5 POVZETEK

### 5 SUMMARY

The genus *Pinus* (Pinaceae) is the largest conifer genus on earth, encompassing more than 100 described species. In Europe, ten native species exist, with Slovenia being home to four: Scots pine (*P. sylvestris* L.), Austrian pine (*P. nigra* Arnold), bog pine (*P. mugo* Turra) and Swiss stone pine (*P. cembra* L.). Pines are particularly valuable on poor and degraded sites, where they play an important role in improving habitat conditions. In Slovenia, the most typical pests of pine trees are the fungi *Acantholyda* sp.; *Cenangium ferruginosum* Fr.; *Corinectria fuckeliana* (C. Booth) C.D. González & P. Chaverri; *Cyclaneusma minus* (Butin) DiCosmo, Peredo & Minter; *Diprion pini* Linnaeus; *Dothistroma* spp. Hulbary; *Lecanosticta acicola* (Thüm.) Syd.; *Neodiprion sertifer* Geoffroy; and *Diplodia pinea* (Desm.) J. Kickx f. In addition, non-native pests and diseases such as *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell, the causal agent of pine pitch canker, also pose a threat. The pine pitch canker disease is believed to have originated in Mexico and has already been reported in Spain, Portugal, France and Italy (though it has been eradicated in France and Italy). Given the favourable climatic conditions and available hosts, the fungus has a high likelihood of establishing and spreading across Europe (Möykkynen et al., 2015; Ogris, 2017; Drenkhan et al., 2020). Since 2010, the Slovenian Forestry Institute has coordinated a national survey programme to monitor *F. circinatum*. We have a collection of a wide range of fungal species isolated from symptomatic pine tissue. The aim of this study was to test the pathogenicity of selected fungal isolates, isolated mainly from symptomatic pine trees during national surveys on *P. sylvestris* and *P. nigra* seedlings.

In May 2022, 57 *P. sylvestris* and 62 *P. nigra* seedlings were inoculated with eight fungal isolates (six or seven per fungus). The isolates were inoculated in the lower part of the stem. The inoculation point was ini-

tially surface sterilised with 70% ethanol, and then a 4 mm diameter wound was made with a sterilised leather punch and inoculated with an agar mycelial plug from the edge of the actively growing cultures. The inoculation points were covered with cotton soaked in sterile water and wrapped in a piece of aluminium foil and parafilm. Control seedlings were inoculated with sterile agar plugs using the same procedure. Re-isolations were performed after 49–105 days by transferring eight (dead seedlings) to 16 (live seedlings) pieces of wood tissue from the margin of each lesion to 3.9% PDA containing streptomycin. The stems were rinsed and scrubbed under running tap water and then surface sterilised. They were soaked in 70% ethanol for 60 seconds, 1% NaOCl for 30 seconds and again in 70% ethanol for 60 seconds. Finally, the samples were rinsed under distilled water. The cultures were grown at 24 °C in the dark. The obtained fungal cultures were grouped into morphotypes, and the representative cultures were selected for further molecular identification. Genomic DNA was extracted from the mycelium, and the ITS rDNA region was amplified using primer pairs ITS1 and ITS4. The obtained PCR products were purified and sequenced in both directions. The sequences were visualised, manually edited and used to perform individual searches using the BLASTn and BOLD systems. The obtained data on wood staining length, re-isolation success, abundance and mortality rate were analysed using appropriate software.

The inoculation points were mostly completely closed by the end of the pathogenicity test. Obvious necrosis was noted only in seedlings inoculated with *D. pinea*, where the longest necrosis (63 mm) was also recorded. Re-isolations were successful only when inoculated with *D. pinea*, *Di. eres* and *Fusarium* sp. 2. The average necrosis length of *P. sylvestris* seedlings inoculated with *D. pinea*, *Di. eres* and *Tympanis* sp. was significantly higher than that of the control seedlings ( $p < 0.05$ ). In *P. nigra* seedlings, the difference between the average necrosis length in the control was significantly lower than that length in the seedlings inoculated with *D. pinea* and *Tympanis* sp. ( $p < 0.05$ ). In addition, isolations from necrosis margins revealed a wide range of fungal species, with the most common being *Diaporthe* sp. and *Fusarium* sp. The colonization rate was 88.2% for *P. nigra* and 77.8% for *P. sylvestris*. Re-isolations from *P. sylvestris* seedlings yielded the identification of 13 taxa, while 16 taxa were identified from *P. nigra*.

Re-isolations were initiated at the first signs of seedling dieback, but this decision later proved to be incorrect, as dieback was most likely not primarily caused by the inoculated fungi. We hypothesized that

extending the experiment would have increased the likelihood of successful re-isolation of the inoculated fungi. The differences in pathogenicity among the tested fungal isolates were not obvious. However, *D. pinea* showed the highest pathogenicity in our experiment. We suspect that we terminated the experiment prematurely under the assumption that the seedlings died from the inoculated fungi. However, they most likely died due to drought stress and pre-existing endophytes, such as *Diplodia* sp., *Diaporthe* sp. and *Fusarium* sp. Perhaps an extension of the experiment would have yielded different results, and re-isolation of the inoculated fungi would also have been more successful.

## ZAHVALA

### ACKNOWLEDGEMENTS

Prispevek je nastal v okviru strokovne naloge s področja zdravstvenega varstva rastlin (UVHVVR, MKGP, št. C2337-22-000020) ter raziskovalnega programa P4-0107 (ARIS). Za izdatno tehnično pomoč pri inokulacijah in reizolacijah se zahvaljujemo Maši Zagorac, Špeli Jagodic in Nuši Avguštinčič, za pomoč pri sadnji pa celotni ekipi Oddelka za varstvo gozdov na GIS.

## VIRI

### REFERENCES

- BOLD. <https://www.boldsystems.org/index.php> (5. 8. 2022).
- Bragança H., Diogo E., Moniz F., Amaro P. 2009. First report of pitch canker on pines caused by *Fusarium circinatum* in Portugal. *Plant Disease*, 93, 10: 1079. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-10-1079A>
- Brodde L., Adamson K., Camarero J.J., Castaño C., Drenkhan R., Lehtijärvi A., Luchi N., Migliorini D., Sánchez-Miranda A., Stenlid J., Özdag S., Oliva J. 2019. *Diplodia* tip blight on its way to the North: Drivers of disease emergence in Northern Europe. *Frontiers in Plant Science*, 9: 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01818>
- Brus R. 2008. *Dendrologija za gozdarje*. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire
- Carlucci A., Colatruglio L., Frisullo S. 2007. First report of pitch canker caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus halepensis* and *P. pinea* in Apulia (Southern Italy). *Plant Disease*, 91, 12, 1683. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-12-1683C>
- Chaisiri C., Liu X., Lin Y., Fu Y., Zhu F., Luo C. 2021. Phylogenetic and haplotype network analyses of *Diaporthe eres* species in China based on sequences of multiple loci. *Biology*, 10, 3, 179: 1-21. <https://doi.org/10.3390/biology10030179>

- Crous P.W., Lombard L., Sandoval-Denis M., Seifert K.A., Schroers H.J., Chaverri P., Gene J., Guarro J., Hirooka Y., Bensch K., Kema G.H.J., Lamprecht S.C., Cai L., Rossman A.Y., Stadler M., Summerbell R.C., Taylor J.W., Ploch S., Visagie C.M., Yilmaz N., Frisvad J.C., Abdel-Azeem A.M., Abdollahzadeh J., Abdolrasouli A., Akulov A., Alberts J.F., Araújo J.P.M., Ariyawansa H.A., Bakhshi M., Bendiksby M., Ben Hadj Amor A., Bezerra J.D.P., Boekhout T., Camara M.P.S., Carbia M., Cardinali G., Castaneda-Ruiz R.F., Celis A., Chaturvedi V., Collemare J., Croll D., Damm U., Decock C.A., de Vries E.P., Ezekiel C.N., Fan X.L., Fernández N.B., Gaya E., Gonzales C.D., Gramaje D., Groenewald J.Z., Grube M., Guevara-Suarez M., Gupta V.K., Guarnaccia V., Haddaji A., Hagen F., Haelewaters D., Hansen K., Hashimoto A., Hernandez-Restrepo M., Houburken J., Hubka V., Hyde K.D., Iturriaga T., Jeewon R., Johnston P.R., Jurjević Ž., Karalti I., Korsten L., Kuramae E.E., Kušan I., Labuda R., Lawrence D.P., Lee H.B., Lechat C., Li H.Y., Litovka Y.A., Maharachchikumbura S.S.N., Marin-Felix Y., Matio Kemkuignou B., Matočec N., McTaggart A.R., Mičoch P., Mugnai L., Nakashima C., Nilsson R.H., Noumeur S.R., Pavlov I.N., Peralta M.P., Phillips A.J.L., Pitt J.I., Polizzi G., Quaadvlieg W., Rajeshkumar K.C., Restrepo S., Rhaïem A., Robert J., Robert V., Rodrigues A.M., Salgado-Salazar C., Samson R.A., Santos A.C.S., Shivas R.G., Souza-Motta C.M., Sun G.Y., Swart W.J., Szoke S., Tan Y.P., Taylor J.E., Taylor P.W.J., Tiago P.V., Vaczy K.Z., van der Wiebe N., van der Merwe N.A., Verkley G.J.M., Vieira W.A.S., Vizzini A., Weir B.S., Wijayawardene N.N., Xia J.W., Yanez-Morales M.J., Yurkov A., Zamora J.C., Zare R., Zhang C.L., Thines M. 2021. *Fusarium*: more than a node or a foot-shaped basal cell. *Studies in Mycology*, 98: 1–184. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2021.100116>
- Drenkhan R., Ganley B., Martín-García J., Vahalík P., Adamson K., Adamčíková K., Ahumada R., Blank L., Bragança H., Capretti P., Cleary M., Cornejo C., Davydenko K., Diez J.J., Lehtijärvi H.T.D., Dvorač M., Enderle R., Fourie G., Georgieva M., Ghelardini L., Hantula J., Ios R., Iturriza E., Kanetis L., Karpun N.N., Koltay A., Landeras E., Markovskaja S., Mesanza N., Milenković I., Musolin D.L., Nikolaou K., Nowakowska J.A., Ogris N., Oskay F., Oszako T., Papazova-Anakieva I., Paraschiv M., Pasquali M., Pecori F., Raffoss T., Raitelaityte K., Raposo R., Robin C., Rodas C.A., Santini A., Sanz-Ros A.V., Selikhovkin A.V., Solla A., Soukainen M., Soulioti N., Steenkamp E.T., Tsoelas P., Vemić A., Vettraino A.M., Wingfield M.J., Woodward S., Zamora-Ballesteros C., Mullett M.S. 2020. Global geographic distribution and host range of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pine pitch canker. *Forests*, 11, 724: 1–40. <https://doi.org/10.3390/f11070724>
- Farjon A., Styles B.T. 1998. *Pinus* (Pinaceae). V: Flora Neotropica Monograph 75. New York, New York Botanical Garden: 68.
- First report of *Gibberella circinata* in France. 2006. V: EPPO Reporting Service no. 5. Paris, France, EPPO Reporting Service.
- FUSARIOID-ID. <https://www.fusarium.org/page/Poly%20ID%20Fusarium> (5. 8. 2022).
- Fusarium circinatum*. 2022a. <https://gd.eppo.int/taxon/GIBBCI/distribution> (24. 11. 2022).
- Fusarium circinatum*. 2022b. EPPO datasheets on pests recommended for regulation. [https://gd.eppo.int/taxon/GIBBCI/download/datasheet\\_pdf](https://gd.eppo.int/taxon/GIBBCI/download/datasheet_pdf) (24. 11. 2022).
- Ganley R.H., Watt M.S., Manning L., Iturriza E. 2009. A global climatic risk assessment of pitch canker disease. *Canadian Journal of Forest Research*, 39: 2246–2256. <https://doi.org/10.1139/X09-131>
- GenBank. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (5. 8. 2022).
- Gomes R.R., Glienke C., Videira S.I.R., Lombard L., Groenewald J.Z., Crous P.W. 2013. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia*, 31: 1–41. <https://doi.org/10.3767/003158513X666844>
- Gozdni fondi (stanje 2021). Ljubljana, Zavod za gozdove Slovenije. (Neobjavljeno).
- Gräfenhan T., Schroers H.J., Nirenberg H.I., Seifert K.A. 2011. An overview of the taxonomy, phylogeny, and typification of necrotrophic fungi in *Cosmospora*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Stilbella*, and *Volutella*. *Studies in Mycology*, 68: 79–113. <https://doi.org/10.3114/sim.2011.68.04>
- Gross A., Holdenrieder O., Pautasso M., Queloz V., Sieber T.N. 2014. *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the causal agent of European ash dieback. *Molecular Plant Pathology*, 15, 1: 5–21. <https://doi.org/10.1111/mpp.12073>
- Groves J.W., Leach A.M. 1949. The species of *Tympanis* occurring on *Pinus*. *Mycologia*, 41, 1: 59–76. <https://www.jstor.org/stable/3755272> (23. 2. 2023).
- Hirooka Y., Rossman A.Y., Chaverri P. 2011. A morphological and phylogenetic revision of the *Nectria cinnabarina* species complex. *Studies in Mycology*, 68: 35–56. <https://doi.org/10.3114/sim.2011.68.02>
- Hirooka Y., Rossman A.Y., Samuels G.J., Lechat C., Chaverri P. 2012. A monograph of *Allantonectria*, *Nectria*, and *Pleonectria* (*Nectriaceae*, *Hypocreales*, *Ascomycota*) and their pycnidial, sporodochial, and synnematosous anamorphs. *Studies in Mycology*, 71: 1–210. <https://doi.org/10.3114/sim0001>
- Izvedbena uredba komisije (EU) 2019/2072. 2019. Uradni list EU, 319/1. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32019R2072&from=EN> (4. 9. 2023).
- Izvedbeni sklep komisije (EU) 2019/2032. 2019. Uradni list EU, 313/94. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32019D2032> (4. 9. 2023).
- Jacobs-Venter A., Laraba I., Geiser D.M., Busman M., Vaughan M.M., Proctor R.H., McCormick S.P., O'Donnell K. 2018. Molecular systematics of two sister clades, the *Fusarium concolor* and *F. babinda* species complexes, and the discovery of a novel microcycle macroconidium-producing species from South Africa. *Mycologia*, 110, 6: 1189–1204. <https://doi.org/10.1080/00275514.2018.1526619>
- Jurc M. 2011. Gozdna zoologija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire
- Kowalski T., Bilański P., Kraj W. 2017. Pathogenicity of fungi associated with ash dieback towards *Fraxinus excelsior*. *Plant Pathology*, 66: 1228–1238. <https://doi.org/10.1111/ppa.12667>
- Landeras E., García P., Fernández Y., Braña M., Fernández-Alonso O., Méndez-Lodos S., Pérez-Sierra A., León M., Abad-Campos P., Berbegal M., Beltrán R., García-Jiménez J., Armengol J. 2005. Outbreak of pitch canker caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus* spp. in northern Spain. *Plant Disease*, 89, 9, 1015. <https://doi.org/10.1094/PD-89-1015A>
- Maček J. 2008. Gozdna fitopatologija. Ljubljana, Zavod za gozdove Slovenije: Zveza gozdarskih društev, Gozdarska založba
- Möykkynen T., Capretti P., Pukkala T. 2015. Modelling the potential spread of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pitch canker in Europe. *Annals of Forest Science*, 72, 2: 169–181. <https://doi.org/10.1007/s13595-014-0412-2>
- Ogris N. 2017. Simulacija potencialnega širjenja borovega smolaste-ga raka (*Fusarium circinatum*) v Sloveniji. V: Zbornik predavanj in referatov 13. Slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo: Rimske toplice, 7.-8. marec 2017. Društvo za varstvo rastlin Slovenije: 212–221.
- Pest survey card on *Fusarium circinatum*. 2020. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2020.EN-1842>
- PM 7/91 (2) *Fusarium circinatum* (formerly *Gibberella circinata*). 2019. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 49, 2: 228–247. <https://doi.org/10.1111/epp.12587>
- Programi preiskav za ugotavljanje navzočnosti škodljivih organizmov rastlin. 2022. Ljubljana, Uprava RS za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin. [https://www.zdravgozd.si/dat/posebni\\_nadzori/kompilacija/2022.pdf](https://www.zdravgozd.si/dat/posebni_nadzori/kompilacija/2022.pdf) (23. 2. 2023).

- R Core Team. 2019. R: a language and environment for statistical computing. <http://www.R-project.org> (27. 10. 2023).
- Salgado-Salazar C., Crouch J.A. 2019. Genome resources for the stem and bark canker pathogens *Corinectria fuckeliana*, *Neonectria hederæ* and *N. punicea*. *Plant Disease*, 103: 389–391. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-18-0904-A>
- Vilgalys R., Hester M. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology*, 172, 8: 4238–4246. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC213247/pdf/jbacter00122-0118.pdf> (23. 2. 2023).
- White T.J., Bruns T.D., Lee S., Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. V: PCR protocols: A guide to methods and applications. New York, Academic Press: 315–322.
- Wikler K., Gordon T.R. 2000. An initial assessment of genetic relationships among populations of *Fusarium circinatum* in different parts of the world. *Canadian Journal of Botany*, 78: 709–717. <https://doi.org/10.1139/b00-044>