

Eesti Maaülikool
Metsandus- ja maaehitusinstituut

Keskkonnainvesteeringute Keskuse
2013.a. metsanduse programmi projekt nr. 6018

Saaresurma epideemiline analüüs tõrjestrategia alusena

täitmise lühiaruanne

Koostasid: Rein Drenkhan, Kalev Adamson, Tiia Drenkhan ja Märt Hanso

Tartu 2015

Sisukord

| | |
|---|----|
| 1. SISSEJUHATUS..... | 4 |
| 2. MATERJAL JA METOODIKA..... | 6 |
| 2.1. Katsealade valik ja monitooring | 6 |
| 2.1.1. Katsealade valik ja haigusproovid (üleriigiline seirevõrk ning püsivaatlusalad) | 6 |
| 2.1.2. Katsealad ja haigusproovid välisriikidest | 7 |
| 2.1.3. Kogutud saare (<i>Fraxinus</i> spp.) liikide herbaareksemplarid..... | 8 |
| 2.1.4. Saare seemnete kogumise põhimõtted ja päritolu | 10 |
| 2.2. Laboratoorsed mikrobioloogilised uurimustööd | 11 |
| 2.3. Molekulaarsed (DNA) uuringud..... | 12 |
| 2.3.1. DNA eraldamine ja PCR analüüsid..... | 12 |
| 2.3.2. PCR produkti kontrollimine agarosgeelis..... | 13 |
| 2.3.4 Haigusetekitaja tüvede DNA sekveneerimine Sangeri meetodil ja ITS järjestuste võrdlemine Genipanga (GENBANK) andmetega | 13 |
| 3. UURIMISTÖÖ TULEMUSED..... | 13 |
| 3.1. Sauresurma leviku ulatus ja kahjud Eestis..... | 13 |
| 3.1.1. Erinevate saareliikide tervisliku seisundi analüüs | 13 |
| 3.1.2. Hariliku saare loodusliku uuenduse hinnangud..... | 14 |
| 3.1.3. Saarepuude tervisliku seisundi hinnang metsas..... | 15 |
| 3.1.4. Sauresurma tekitaja sporulatsioon | 18 |
| 3.2. Sauresurma võimalik introduktsioon Eestisse | 22 |
| 3.2.1. Mandžuuria saare (<i>Fraxinus mandshurica</i>) introduktsioon ja seosed sauresurmaga | 23 |
| 3.2.2. Sauresurm herbaareksemplaridel..... | 24 |
| 3.2.3. Haigusproovide esmaanalüüs Venemaa Kaug-Idast | 26 |
| 3.3. Saareseemne kogumine ja analüüs | 27 |
| 3.3.1. Kogutud saare seeme ja katseala rajamise plaanid..... | 27 |
| 3.3.2. Seemnetega tehtud analüüsid | 28 |

| | |
|--|----|
| 3.4. Majandamissoovitused saaresurma vastu | 28 |
| KOKKUVÕTE..... | 29 |
| KASUTATUD KIRJANDUS | 31 |
| LISAD | 32 |

1. SISSEJUHATUS

21. sajandi algus tõi kogu maailmas, sealhulgas ka Euroopas, eriti aga just Põhja-Euroopas endaga kaasa hulgaliselt uusi metsakaitseprobleeme, millistest ehk isegi olulisimad kuuluvad puude haiguste, seega metsapatoloogia valdkonda. Ilmselt on vastavad muutused toimunud kahe suure teguri – 20. sajandi viimasel kümnendil alanud kliima (eriti talvekliima) soojenemise, kuid ka globaalse kaubanduse, s.h. elustaimede (seemned, istikud) ja puit-pakke- ja –täidismaterjalide transpordi tohtu kasvu tõttu nii kontinentide siseselt kui ka nende väliselt.

Sellele eelnenud, paar viimast sajandit kestnud kontrollimatu puuseemnete levitamine – alates taskupõhjas kaasatoomisest turismi- ja muudelt reisidelt kuni teadlikuma ja ulatuslikuma „võõrpuuliikide introduksiooni“ nime all toimunud tegevusteni. Võõra päritoluga puuseemnete muldasängitamine on loonud paljudes paikades, nii ka Eestis, olukorra, kus talvekülmade kui lõunapoolseid haigusetekitajaid seni takistanud teguri äralangemise tõttu saabuvad patogeenid leiavad uut, põhjapoolsetel aladel eest ka „kaetud laua“ neile kodumaalgi enim-sobinud puuliikide näol. Ja pole imestada, et tagajärjed võivad osutuda ja ongi osutunud katastroofiliseks! Nagu näiteks karantiinsete puna- ja pruun-vöötaudi puhul okaspuudel või uue invasiivse metsahaiguse – saaresurma näol meie lehtpuumetsades ning haljasaladel.

Saaresurma puhul avaldub aga veel hoopis teinegi, nii inim- kui taimepatoloogias põhimõtteliselt juba varemgi tuntud aspekt: äsja sissetoodud haigusetekitajaga on kohalikul populatsioonil ajalooliselt (s.o. evolutsioonis) puudunud igasugune kontakt ja patogeenile kohastumata peremehe (inimese või taime) ootamatu kontakt virulentse uustulnukaga lõpeb ränga epideemiaga (nagu näit. Ameerika indiaanlastelt pärinev süüfilis Euroopas, kartuli lehemädanik põllumajanduslikus ja - miks mitte, ka saaresurm metsapatoloogias).

Epidemioloogia ongi teadus, mis „ajab jälgi“ epideemiateks arenenud/kujunenud haigustel, üritades mõista põhjusi ja seoseid, mis töid endaga kaasa sedavõrd tõsiseid tagajärgi majandusele, kuid ka looduslikule mitmekesisusele ja –tasakaalule – muidugi selleks, et luua teoreetilised alused senistele järgnevate uute ebasoovitavate tulnukate kiireks avastamiseks ning nende vastase tõrjestrategia väljatöötamiseks.

Ja taas, nagu vöötaudide puhul okaspuudel, ei saa ka saaresurma sündroomi uurimisel läbi „kaksikvendadeta“, s.o. palju segadust tekitavate, morfoloogiliselt äärmiselt raskesti eristatavate sõsarliikideta, millised on aga äärmiselt erineva virulentsuse ja teiste käitumistunnustega. Nii on see juhtunud ka saaresurma sündroomis.

Saaresurma puhul, millist tunnet, täpsemalt väljendudes – millist oleme kogenud kasvava puhangu all, alles vähem kui kümme aastat, ei saa me veel muidugi palju rääkida tema „tundmisest“. Mis puutub saaresurma, siis käesolevaga aruantava KIK'i uurimisprojekti eelselt olime Eestis teaduslikult vaieldamatult/ümberlukkamatult tõestanud tema esinemise ja kiire edenemise ning DNA-metoodika abil (tänu KIK'i rahastusel loodud DNA-laborile meie töörühma käsutuses!) identifitseerinud patogeeni kuuluvuse samasse, Euroopa keskosast

lähtuvasse (mis on küll alles hüpoteesi tasemel!) epideemiasse. Ja kogu muu saareurma epidemioloogilises uurimistöös saadud informatsioon käesolevas aruandes on hangitud juba käesoleva, samuti KIK'i rahastusel toimunud projekti raames.

Tihe koostöö EMÜ (ja sellele eelnenud ZBI) mükoloogidega on andnud meile saaresurma epidemioloogilisel „jälgede ajamisel“, so. patogeeni ja tema süütu sõsarliigi ajaloo uurimisel Eestis (ja fragmentaarselt ka väljaspool Eestit!) väärtuslikke vihjeid ajast, mil kõnealust mikrosoent ei peetud veel ohtlikuks patogeeniks.

Probleemi ulatust ja tõsidust arvestades kogu Euroopas pole meie uurimisrühm ainus, kes saaresurma epidemioloogiaga tegeleb. Tugevad rühmad tegutsevad Kesk-Euroopas (eriti Šveitsis ja Tšehhis) ning Põhjalamaadest Norras ja Rootsis. Nendega on meil tihe koostöö ja informatsiooni vahetus mitte ainult konverentsidel, vaid ka seminaridel (COST projekti Fraxback), „töötubades“ (Workshops) ja ühistel ekspeditsioonidel (nagu näiteks aruandeperioodil toimunu Venemaa Kaug-Itta - saaresurma tekitaja alg-kodumaale).

2. MATERJAL JA METOODIKA

2.1. Katsealade valik ja monitooring

2.1.1. Katsealade valik ja haigusproovid (üleriigiline seirevõrk ning püsivaatlusalad)

Püsivaatlusalasid oli Eestis 5: Tartumaa - Nõgiaru (*Fraxinus excelsior*), Tartumaa- Järvelja ehk Agali (*F. mandshurica*, *F. pennsylvanica*), Tartumaa - Vedu (*F. excelsior*), Tartu linn - Tähtvere (*F. nigra*, *F. americana*), Viljandimaa- Aimla (*F. excelsior*). Nendelt aladelt korjati viljakehade esinemise perioodil ülalnimetatud saareliikide mudelpuude leherootse vähemalt 4 korda kuus.

Eksoot-saareliikide tervislikku seisundit hinnati kokku 20 proovipaigas üle Eesti: Põltsamaa, Jõgeva ja Mustvee linnad; arboretumid: Luua Palamuse vallas, Agali Võnnu vallas, Kuremäe Rõuge vallas; dendraariumid: Völumäe Rägavere vallas, Kõnnu Illuka vallas, Rõugu Türi vallas, Lasva Lasva vallas, Mõisaküla (Antsuvälja) Torgu vallas, Neemi (M. Ranna) Põide vallas, Eesti Maaülikooli Metsamaja Tartus, J. Alas Valjala vallas, Tihemetsa Volveti mõisa dendraarium Saarde vallas, Raadi dendraariumis Tartus; mõisapargid: Kaagjärve Karula vallas, Räpinas Sillapää pargis, Sangaste metsapargis ja Hummuli pargis. Kõik uuritud saarepuud jagati nelja kategooriasse: terve, surevate võrsetippudega, pool võra surnud ja kogu puu surnud. Tulemused on esitatud proovitükkide kaupa protsentuaalselt (Tabel 1).

2014. aastal hinnati hariliku saare loodusliku uuenduse seisundit kolmes maakonnas: Jõgevamaal Luual (6 proovitükil), Viljandimaal (6 proovitükil) ja Läänemaal (5 proovitükil). Eelistati üle 50%-lise, s.o. saarenamusega puistuid. Igal proovitükil tehti lähtuvalt ala suuruselt 2-6 prooviringi 5,64 m raadiusega. Ühe prooviringi pindala oli seega 100 m². Võimalusel tehti 4 prooviringi hektari kohta. Iga prooviringi ulatuses loeti üle saare järelkasv, jagades noored puud nelja kategooriasse: terve (ilma nähtavate haigustunnusteta), haige (koorenekroosi, närbunud lehtede või muu haigusele viitava tunnusega), vigastatud (ulukikahjustuse või muu mehaaniline vigastusega), ebaselge (võimalikud haigustunnused esinesid väga vähesel määral).

Samal, s.o. 2014. aastal tehti hariliku saare tervisliku seisundi hinnanguid Jõgevamaal Luual (3 proovitükil), Viljandimaal (3 proovitükil), Läänemaal (5 proovitükil). Proovitükkidel metsas ehk vanemates puistutes hinnati visuaalselt saarte tervist, jagades seejuures saared

proovitüki piires nelja kategooriasse: terved, surevate võrsetippudega, pool võrast surnud ja surnud puud. Tulemused on esitatud proovitükkide kaupa protsentuaalselt (Tabel 3).

Aastatel 2002-2014 jälgiti säilikpuude seisundit kokku 577 harilikul saarel 141 lageraielangil. Uuendusraied olid antud aladel tehtud aastatel 2001-2002. Langid asusid Soomaal (6 lanki, kokku 29 puud), Laevas (28 lanki, kokku 483 puud) ja Alatskivil (7 lanki, kokku 65 puud). Analüüsitavad puud jagati kolme gruppi: a) puud, mis olid juba enne uuendusraiet metsa servas avatult seisnud (vähemalt 15 m ilma metsata ala); b) uuendusraielangi serva läheduses kasvavad puud; c) uuendusraie langi keskel asetsevad puud.

Alates 2009. aastast hinnati puuvõrade tervisliku seisundit. Kõikidele puudele anti neljast kategooriast koosnev hinnang: terve, surevate võrsetippudega, pool võra surnud ja surnud puud. Üldmääritud aladelt koguti juurdekasvupuuriga piduproove ja ka leherootse, kokku 102-lt puult. Need 102 puu proovid on analüüsitud käesoleva projekti raames.

Sauresurma tekitaja levib eoste abil anemohoorselt, teadaolevalt peamiselt just sugulise arengujärgu kotteoste (askosporide) abil, mis vallanduvad viljakehadest sporulatsiooni käigus. Sporulatsiooni analüüsiks loeti välitingimustest laborisse toodud hariliku saare leherootsudelt kokku seal kasvavad sauresurma tekitaja viljakehad ja leiti iga proovitüki kohta keskmine viljakehade arv leherootsu kohta. Keskmine viljakehade arv leiti 18 juhuslikult valitud leherootsu põhjal proovitüki kohta. Samuti tehti iga proovitüki kohta 3 preparaati sauresurma tekitaja viljakehadest, et hinnata sauresurma tekitaja (*Hymenoscyphus fraxineus*) sporulatsiooni või eoste produktsiooni seisundit. Selleks peenestati 1-3 viljakeha (sõltuvalt viljakehade suurusest) skalpelliga ja vaadeldi preparaati mikroskoobiga, kasutades 600-kordset suurendust. Preparaadi kolmes juhuslikus vaateväljas loetleti kõik nähtavad *H. fraxineus*’i eoskotid ehk askused ja kotteosed, sealjuures loeti ka askustes paiknevaid eoseid, et määrata kindlaks, kas tegu on juba osaliselt eoseid väljapaisanud eoskotiga.

2.1.2. Katsealad ja haigusproovid välisriikidest

2.1.2.1. Kaug-Ida

Mandžuuria saare (*F. mandshurica*) ja *F. rhynchophylla* proove koguti vahemikus august-september 2014 Venemaa Kaug-Idast kolmest asukohast (Khabarovsk, Vladivostok Russky

saarel ja Ussuuri looduskaitseala). Koguti lehti, seemneid, võrseid ja sümptomaatiliste viljakehadega leherootsusi. Proovid on ette valmistatud saaresurma tekitaja populatsioonigeneetilisteks analüüsideks

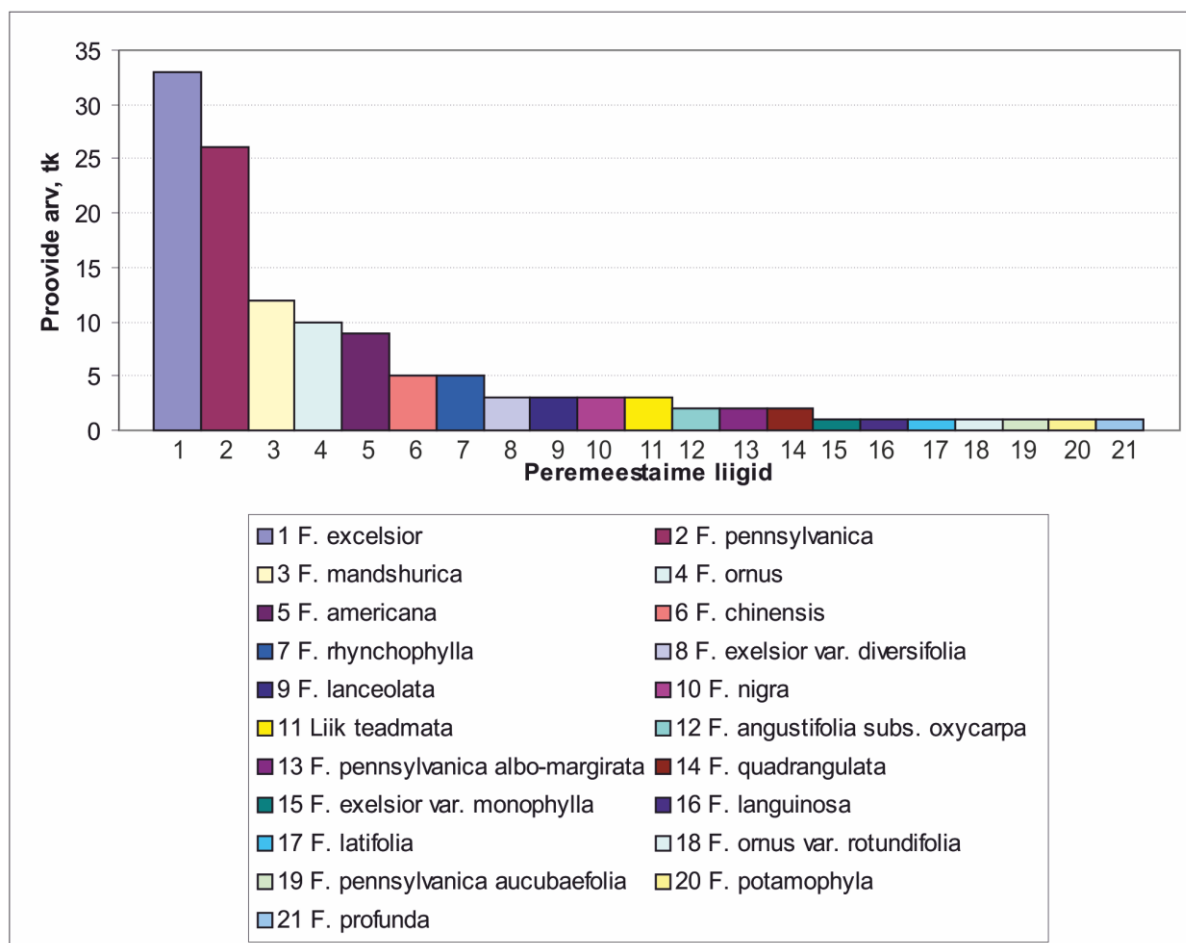
2.1.2.2. Gruusia

Proovid koguti kolmes erinevast asukohast harilikult saarelt 5. ja 6. mail 2015. aastal Borjomi-Kharagauli rahvuspargist Gruusias.

2.1.3. Kogutud saare (*Fraxinus* spp.) liikide herbaareksemplarid

Herbaareksemplaride analüüsi ülesandeks oli välja selgitada kas *H. fraxineus* võis esineda juba varasemal ajaperioodil kui on 1990-ndate keskpaigast alates teada olevad surevad saarikud. *H. fraxineus*'e võimaliku varasema kohalolu hüpoteesi kinnitamiseks võeti proovid Eesti Maaülikooli rahvusvahelisest seenekogust (<http://natarc.ut.ee/seenekogud.php>), Eesti Maaülikooli dendroloogiaklassi herbaareksemplaridelt, Tartu Ülikooli loodusmuuseumi herbaareksemplaridelt ning Tallinna Botaanikaia herbaareksemplaridelt. Eesti Maaülikooli rahvusvahelisest seenekogust analüüsiti saare leherootse viljakehadega ja ilma viljakehadeta, kokku 13 proovi. Eesti Maaülikooli dendroloogiaklassi herbaareksemplaridelt võeti kokku 48 proovi. Tartu Ülikooli loodusmuuseumi herbaareksemplaridelt võeti kokku 47 proovi ning Tallinna Botaanikaia herbaareksemplaridelt võeti 30 proovi. Igast eksemplarist võeti kaks proovi, üks analüüsiks ning teine varuks ja kontrolliks.

Kolme herbaariumi peale kokku võeti proovid 20-lt erinevalt saareliigilt ja -vormilt (Joonis 1). Nimetatud joonisel ei kajastu seenekogu proovid.

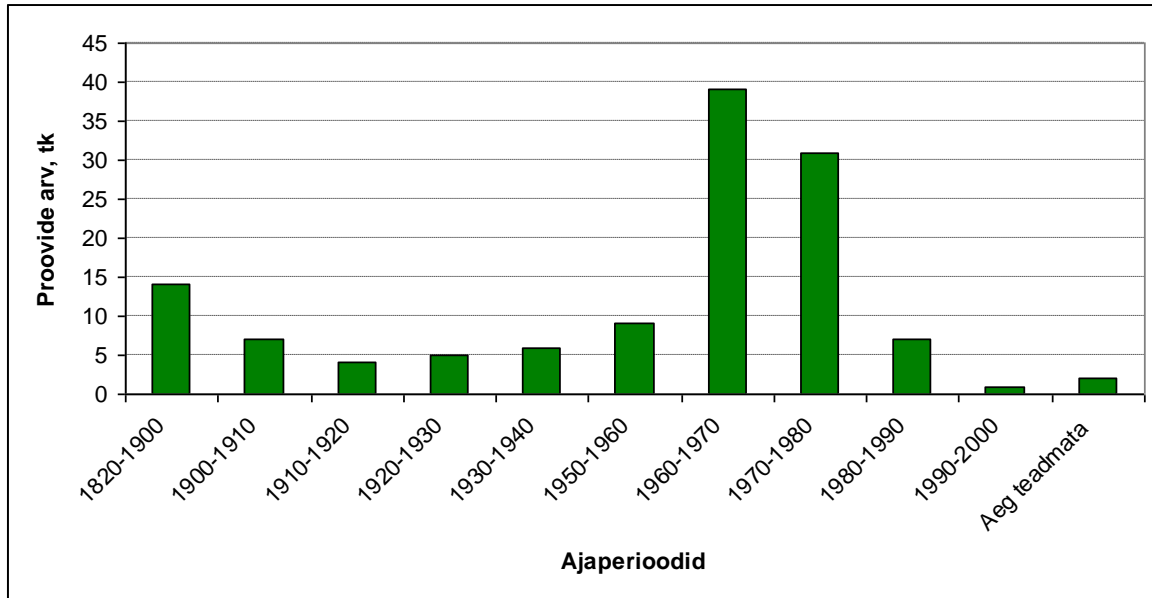


Joonis 1. Töös uuritud herbaareksplaride jaotus saareliikide lõikes

Suurim kogus andmeid koguti hariliku saare herbaareksplaridelt, mida oli kokku 33 proovi, sellele järgnesid pensilvaania saar (26), mandžuuria saar (12) ja õis-saar (10). Teised liigid ja vormid olid esindatud vähem kui kümne eksemplariga, kolme saarevõrse puhul ei olnud täpset liiki võimalik tuvastada.

Kõige vanem herbaareksemplar, millelt proov võeti oli pärit aastast 1821 ning kõige hilisemaks osutus proov aastast 2006. Ajaperiood, mis proovidega kaeti, on seega 184 aastat. Ainus kümnend, mis 20. sajandil on proovideta on 1940-ndad, mil Teise maailmasõja tõttu herbaareksplaride korjamine oli raskendatud. Kõige enam informatsiooni õnnestus saada 20-nda sajandi kuuekümnendatest ja seitsmekümnendatest, nende kahe kümnendi kohta korjatud proovide hulk moodustab võetud proovide koguhulgast 48%. Täpsemat proovide arvu jaotust ajaliselt vaata jooniselt 2.

Proovide kogumisel ei keskendunud ühelegi kindlale saareliigile, ega ühelegi kindlale korjamise asukohale. Veenduti vaid selles, et kaetud saaks piisavalt suur ajaperiood ning võimalikult suur maa-ala. Analüüsi tegemiseks võeti igalt väljavalitud herbaareksemplari lehelt proovitükk suurusega 1 cm x 1 cm ning asetati steriilsesse Eppendorfi tuubi.



Joonis 2. Erinevatest ajaperioodidest võetud saare herbaareksemplaride proovide arv.

Proovi võtmise asukoht oleneb vaadeldava herbaareksemplari välistest tunnustest. See tähendab seda, et proovid võeti sellistelt kohtadelt saarelehelt, kus oli märgata lehtede tumenemist, musti täppe või mingeid muid sümptomaatilisi tunnuseid. Ristsaaste vältimiseks steriliseeriti skalpell iga proovi võtmise järel. Täiendav info on leitav äsja kaitstud Ahto Agan magistritööst (Agan, 2015).

2.1.4. Saare seemnete kogumise põhimõtted ja päritolu

Hariliku saare seemet koguti 57 erinevast asukohast Eestis ning kokku 117 erinevalt saare puult, s.h ka eksootsaartelt. Seejuures koguti seemet 68-lt väliselt tervelt ning 41-lt haigelt puult, 8 puu tervislik seisund jäi määratlemata. Kõikide puude asukohad on teada ja dokumenteeritud.

Fookuses oli 5 erinevat geograafilist asukohta Eestis järgnevalt:

1. **Läänemaa ja Saaremaa.** Kõige leebema kliimaga ala Eestis ning harilikku saart kasvab enim. 2013. aastal saadi seemet minimaalselt. 2014. aastal koguti enamus vajaminevast seemnest.
2. **Ida-Virumaa.** Põhja rannik ja mere äär, kuid kõige karmima kliimaga (s.o suurima temperatuuri kõikumisega) kants Eestis, saart kasvab kõige vähem. Seemet koguti 2013. aastal ja enamasti tervetelt puudelt ning seemet oli vaid üksikutel haigetel puudel.
3. **Järvamaa ja Jõgevamaa.** Kesk-Eesti päritolu saared. Jõgevamaalt koguti seemet ainult tervetelt puudelt 2013. aastal. Kuid 2014. aastal koguti seemet Järvamaalt, kuna Järvamaa valik oli suurem ja arvestades asukohaga Eestimaa keskel siis jäi valikusse Järvamaa saared.
4. **Tartumaa.** Arvestades katseala loomist Järveljale, siis kohaliku päritolu lisamine katsesse näib mõistlik. 2013. aastal Tartumaal seemet polnud, seega koguti seeme 2014. aastal.

Seega, katseala loomiseks hariliku saare (*F. excelsior*) seeme varuti viiest Eesti maakonnast (Ida-Virumaa, Järvamaa, Läänemaa, Saaremaa ja Tartumaa), välistunnuste põhjal hinnatuna saaresurma poolt kahjustatud ja kahjustamata (5+5) puult. Nimetatud alade seeme läheb katseala rajamiseks Järveljale.

Haigete ja tervete puude seemnel testiti ka saaresurma päritolu.

2.2. Laboratoorsed mikrobioloogilised uurimustööd

Patogeeni isoleerimine lehtedest, seemnetest, võrsetest ja leheroodudelt

Kogutud võrsetel hinnati haigussümptomite olemasolu. Laboris eemaldati võrsetelt koor, peale desinfitseerimist isoleeriti haige ja terve puidu piirilt söötmele puidutükike. Lehetükke, seemneid, puiduproove võeti juhuslikult, iga asukoha kohta vähemalt kolmelt vastavalt substraadilt. Molekulaarsete analüüside teostamiseks (DNA abil haigusetekitaja määramiseks) asetati proovid esmalt Eppendorf tuubidesse.

Eoste püüdmine viljakehadest leherootsudel

Igast asukohast valiti juhuslikult mõnelt leherootsult viljakehad (keskmiselt neli viljakeha ühe leherootsu kohta) ja kinnitati need viljakeha jala abil 90 mm Petri tassi ülemise kaane külge.

Töö eesmärgiks oli koguda virdeagar-söötmele viljakehadest vabanevaid eoseid ja määrata eoste abil haigusetekitaja.

2.3. Molekulaarsed (DNA) uuringud

2.3.1. DNA eraldamine ja PCR analüüsid

DNA eraldati nii puhaskultuuridest kui ka otse substraadist. Substraadi ning puhaskultuuri rakkude purustamiseks lisati tuubidesse steriilsed metallkuulid ja liiv ning see toimus homogenisaatoris Retsch MM400 (Retch GmbH, Saksamaa). DNA eraldamiseks kasutati kit-i E.Z.N.A. Fungal DNA Mini Kit (Omega Bio-Tek Inc., USA), järgides tootjapoolset protokollit. Eraldatud DNA-d säilitati kuni PCR segu valmistamiseni sügavkülmas -20°C juures.

Seente universaalpraimeritega PCR segu sisaldas ühe proovi kohta: 4 µl PCR segu 5 x HOT FIREPol® Blend Master Mix-i (7,5 mM MgCl₂) (Solis BioDyne, Tartu), 0,5 µl kõrgemate seenerühmade praimerit ITS1-F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') (Gardes, Bruns 1993), 0,5 µl seente universaalpraimerit ITS4 (5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.* 1990), 14 µl DNA vaba vett ja 1 µl DNA-d. PCR reaktsioon viidi läbi vastavalt protokollile (Drenkhan *et al.* 2014).

Hymenoscyphus fraxineus-i tuvastamiseks kasutati originaalsete, Eestis loodud liigispetsiifiliste praimerite paari HFrax (Riit 2014). Nimetatud praimeritega PCR segu sisaldas ühe proovi kohta: 4 µl PCR segu 5 x HOT FIREPol® Blend Master Mix Ready to Load (10,0 mM MgCl₂) (Solis BioDyne, Tartu), 0,5 µl vastavaid 20 µM praimereid, 14 µl DNA vaba vett ja 1 µl analüüsitavat DNA-d.

Armillaria spp. tuvastamiseks kasutati samuti originaalset perekonnaspetsiifilist praimerite paari Armi (Riit 2014). Nimetatud praimeritega PCR segu sisaldas ühe proovi kohta: 4 µl PCR segu 5 x HOT FIREPol® Blend Master Mix Ready to Load (10,0 mM MgCl₂) (Solis BioDyne, Tartu), 0,5 µl vastavaid 20 µM praimereid, 14 µl DNA vaba vett ja 1 µl analüüsitavat DNA-d.

2.3.2. PCR produkti kontrollimine agarosgeelis

PCR produkte kontrolliti 1%-lises agarosgeelis. Kõigepealt laeti geeli DNA Ladder, fragmendi pikkusega 100-1000bp (Naxo OÜ). PCR produktid elektroforeesiti agarosgeelis 75 V pinge juures 60 minutit. DNA-lõigu olemasolu ja pikkus tehti kindlaks UV-kiirte all transilluminaatoriga Quantum ST4-3026/WL/25M. Geelpildi vaatamiseks ja töötlemiseks kasutati programmi Quantum ST4 Express v16.04 (Vilber Lourmat SAS, Prantsusmaa).

2.3.4 Haigusetekitaja tüvede DNA sekveneerimine Sangeri meetodil ja ITS järjestuste võrdlemine Geenipanga (GENBANK) andmetega

PCR produktide sekveneerimised tehti Eesti Biokeskuses, Tartus. Sekveneerimiseks kasutati praimerit ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (White et al 1990). Saadud DNA järjestused analüüsiti programmiga Bioedit 7.2.3. Saadud tulemusi võrreldi rahvusvahelises geenipangas National Center for Biotechnology Information olevate andmetega.

3. UURIMISTÖÖ TULEMUSED

3.1. Saaresurma leviku ulatus ja kahjud Eestis

3.1.1. Erinevate saareliikide tervisliku seisundi analüüs

Eksoot-saareliigi tervislikku seisundit hinnati 12 erineval liigil ja kokku 227 puul. Tulemused on toodud tabelis 1. Ainuke oli *F. sogdiana*, millelt õnnestus isoleerida puhaskultuuri saaresurma tekitaja *Hymenoscyphus fraxineus*. Ühtlasi on tegemist esmakordse *H. fraxineus*'e leiuga maailmas nimetatud peremeestaimelt.

Tabel 1. Eksoot-saareliikide tervislik seisund Eesti haljasaladel aastal 2014.

| <i>Puuliik</i> | <i>Valimi- maht (tk)</i> | <i>Terved (%)</i> | <i>Üksikud kuivanud (%)</i> | <i>Pool võra kuivanud (%)</i> | <i>Surnud (%)</i> |
|-------------------------------|----------------------------------|-----------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|
| <i>Fraxinus americana</i> | 11 | 73 | 18 | 0 | 9 |
| <i>F. chinensis</i> | 2 | 100 | 0 | 0 | 0 |
| <i>F. holotricha</i> | 1 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| <i>F. latifolia</i> | 1 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| <i>F. longicuspis</i> | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |

| | | | | | |
|-------------------------|-----|-----|-----|----|-----|
| <i>F. mandshurica</i> | 92 | 62 | 27 | 12 | 0 |
| <i>F. nigra</i> | 7 | 0 | 0 | 86 | 14 |
| <i>F. ornus</i> | 1 | 100 | 0 | 0 | 0 |
| <i>F. paxiana</i> | 1 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| <i>F. pennsylvanica</i> | 108 | 44 | 40 | 10 | 6 |
| <i>F. potamophila</i> | 1 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| <i>F. sogdiana</i> | 1 | 0 | 100 | 0 | 0 |

Eksoot-saareliikide tervislik seisund Eestis on tunduvalt parem kui harilikul saarel, v.a *F. nigra* ja *F. potamophila*, milliseid saaresurm tõsiselt kahjustab. Uuritud ameerika saartest oli terveid 73% ja 18%-il esines võras üksikuid kuivanud oksid.

Kõige kehvas seisus eksootidest oli *F. nigra* puud, milledest koguni 14% olid vaatluse hetkeks juba surnud ning ülejäänud puud enam kui poole võra ulatuses kuivanud. *F. potamophila* puhul oli surnud puude osakaal küll 100%, kuid siin võib põhjuseks tuua väikese valimi, mille tõttu võib neid tulemusi pidada ka juhuslikeks. *F. pennsylvanica* ja *F. mandshurica* seisund oli pigem hea, kuid nende liikide hulgas oli ka puud, mis olid juba surnud või kohe suremas. *F. americana* puud jagunesid kahte gruppi, terved või peaaegu terved ning surnud puud. Tabelis 1 esitatud ülejäänud võõr-saareliikide tervisliku seisundi üldistamine on väikese valimi tõttu ebatäpne (vt. Tee, 2014).

3.1.2. Hariliku saare loodusliku uuenduse hinnangud

Uuritud hariliku saare järelkasvupuude seisundi hinnangud on toodud tabelis 2. Neist selgub, et tervete taimede osakaal looduslikus uuenduses on maakonniti erinev. Tervete taimede suhtarv Jõgeva- ja Läänemaal erines 30% võrra, olles kõige kehvem Lääne-Eestis, kus terveid taimi loendati ainult 38%.

Tabel 2. Hariliku saare loodusliku uuenduse tervisliku seisungi hinnang aastal 2014.

| Proovitüki nimetus | Valimimaht (tk) | Terved (%) | Ebaselge (%) | Haige (%) | Vigastusega (%) |
|--------------------|-----------------|------------|--------------|-----------|-----------------|
| <i>Luu 1</i> | 9 | 22 | 22 | 33 | 22 |
| <i>Luu 2</i> | 344 | 72 | 10 | 12 | 7 |
| <i>Luu 3</i> | 48 | 69 | 6 | 10 | 15 |
| <i>Luu vana 1</i> | 51 | 45 | 2 | 7 | 5 |
| <i>Luu vana 2</i> | 309 | 68 | 8 | 6 | 18 |
| <i>Luu viimane</i> | 2 | 100 | 0 | 0 | 0 |
| Jõgevamaa | 763 | 68 | 8 | 9 | 15 |

| | | | | | |
|----------------------|-------------|-----------|----------|-----------|----------|
| <i>kokku</i> | | | | | |
| <i>Sürgavere 1</i> | 87 | 34 | 3 | 49 | 13 |
| <i>Sürgavere 2</i> | 445 | 52 | 2 | 46 | 0 |
| <i>Sürgavere 3</i> | 45 | 62 | 0 | 38 | 0 |
| <i>Sürgavere 4</i> | 35 | 69 | 3 | 28 | 0 |
| <i>Viljandimaa 1</i> | 235 | 36 | 7 | 44 | 13 |
| <i>Viljandimaa 2</i> | 110 | 46 | 3 | 40 | 11 |
| <i>Viljandimaa</i> | 957 | 47 | 3 | 44 | 6 |
| <i>kokku</i> | | | | | |
| <i>Läänemaa 1</i> | 453 | 45 | 2 | 52 | 1 |
| <i>Läänemaa 2</i> | 74 | 28 | 0 | 69 | 3 |
| <i>Läänemaa 3</i> | 69 | 4 | 0 | 94 | 1 |
| <i>Läänemaa 4</i> | 7 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| <i>Läänemaa 5</i> | 25 | 52 | 4 | 44 | 0 |
| <i>Läänemaa</i> | 628 | 38 | 1 | 59 | 2 |
| <i>kokku</i> | | | | | |
| Kokku | 2348 | 51 | 1 | 47 | 1 |

Kõige tervem hariliku saare looduslik järelkasv oli Jõgevamaal, kus tervete taimede osakaal oli 68%, kuid seal oli seevastu märksa rohkem vigastusega (15%) hariliku saare taimi. Vigastuseks loeti üldiselt ulukikahjustust. Tervete looduslikult uunenud puude hulga varieeruvus Jõgevamaa proovipuistutes oli märkimisväärne, 22% kuni 100%-ni.

Kõigi proovialade kokkuvõttes on aga Eestis haigeid ja terveid puid hariliku saare looduslikus järelkasvus ligikaudu võrdselt, vastavalt 47% ja 51%.

Kokkuvõtteks võib tõdeda, et kehvas tervislikus seisundis on hariliku saare looduslik uuendus Läänemaal ja paremas Jõgevamaal (vt. Palm ja Mälgi 2014 lõputöö).

3.1.3. Saarepuude tervisliku seisundi hinnang metsas

2014. aastal hinnati kolmes maakonnas, Jõgeva-, Viljandi- ja Läänemaal 215 hariliku saare puud kokku 11 puistus. Suhtarvuna väljendades oli kõige enam terveid puid Luua 2 proovialal ning kõige vähem Läänemaa 2 proovialal (Tabel 3).

Tabel 3. Hariliku saare tervislik seisund puistutes aastal 2014.

| <i>Proovitüki nimetus</i> | <i>Valimi-maht (tk)</i> | <i>Terved (%)</i> | <i>Üksikud kuivanud oksad</i> | <i>Pool võra kuivanud</i> | <i>Surnud (%)</i> |
|---------------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------------|---------------------------|-------------------|
|---------------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------------|---------------------------|-------------------|

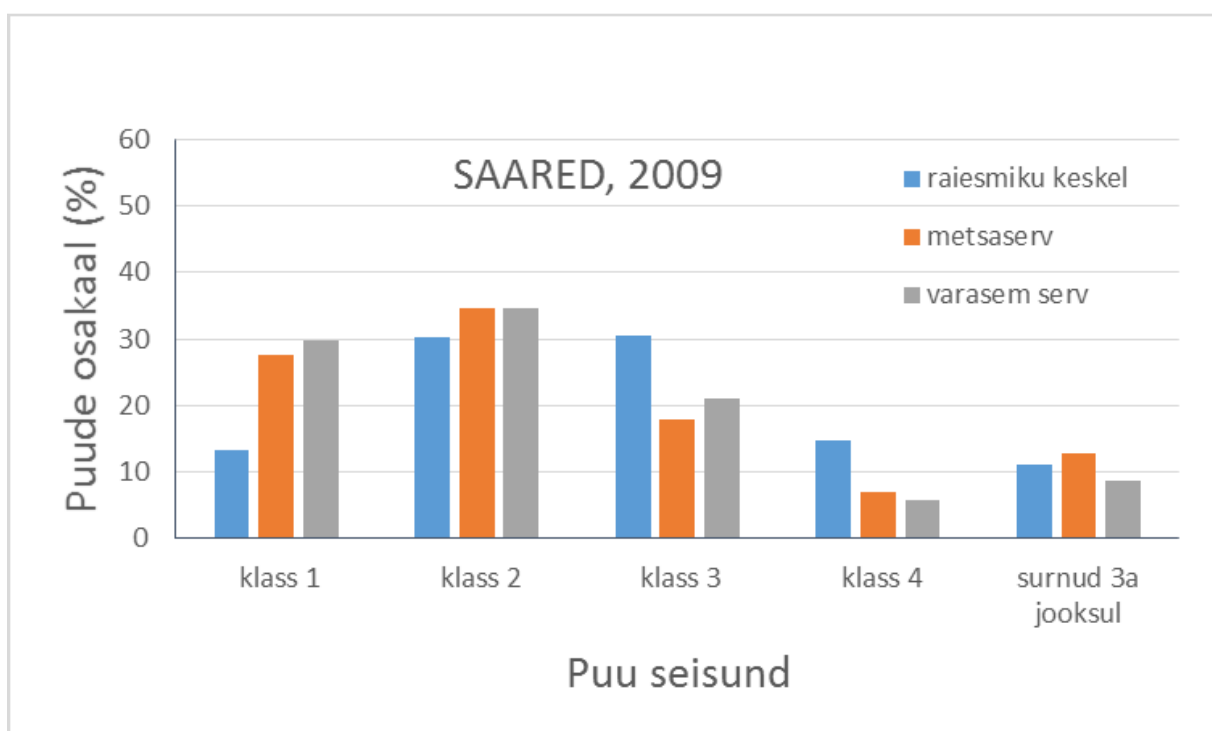
| | | | (%) | (%) | |
|--------------------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <i>Luuu 1</i> | 26 | 4 | 19 | 31 | 46 |
| <i>Luuu 2</i> | 16 | 38 | 19 | 19 | 25 |
| <i>Luuu viimane</i> | 10 | 10 | 20 | 30 | 40 |
| <i>Jõgevamaa kokku</i> | 52 | 17 | 19 | 27 | 37 |
| <i>Sürgavere 4</i> | 11 | 27 | 36 | 9 | 27 |
| <i>Viljandimaa 1</i> | 16 | 25 | 38 | 19 | 19 |
| <i>Viljandimaa 2</i> | 18 | 6 | 33 | 28 | 33 |
| <i>Viljandimaa kokku</i> | 45 | 19 | 36 | 19 | 26 |
| <i>Läänemaa 1</i> | 33 | 15 | 30 | 29 | 26 |
| <i>Läänemaa 2</i> | 30 | 3 | 3 | 17 | 77 |
| <i>Läänemaa 3</i> | 12 | 8 | 8 | 17 | 67 |
| <i>Läänemaa 4</i> | 12 | 8 | 8 | 25 | 59 |
| <i>Läänemaa 5</i> | 31 | 19 | 19 | 19 | 43 |
| <i>Läänemaa kokku</i> | 118 | 11 | 14 | 21 | 54 |
| Kokku | 215 | 14 | 21 | 22 | 43 |

Kõige halvemas seisundis olid vanad puud Läänemaal, kus 54% kõigist hinnatud saartest oli surnud ning terved olid vaid 11% puudest. Puid, millel oli pool võra surnud oli 21% ja surevate võrsetippudega 14%. Kõige parem oli vanade saarte tervis Viljandimaal, kus surnud puude osakaal oli 26% ning terveid puud oli 19%. Kõige enam esines Viljandimaal surevate võrsetippudega puud (36%). Puid, millel oli pool võra surnud, oli 19%. Ka Jõgevamaal oli saarikute seisund umbes samasugune: surnud ja terveid puud vastavalt 37% ja 17%. Pool võra surnud oli 27% puudest ja surevate võrsetippudega puud oli Jõgevamaal 19%.

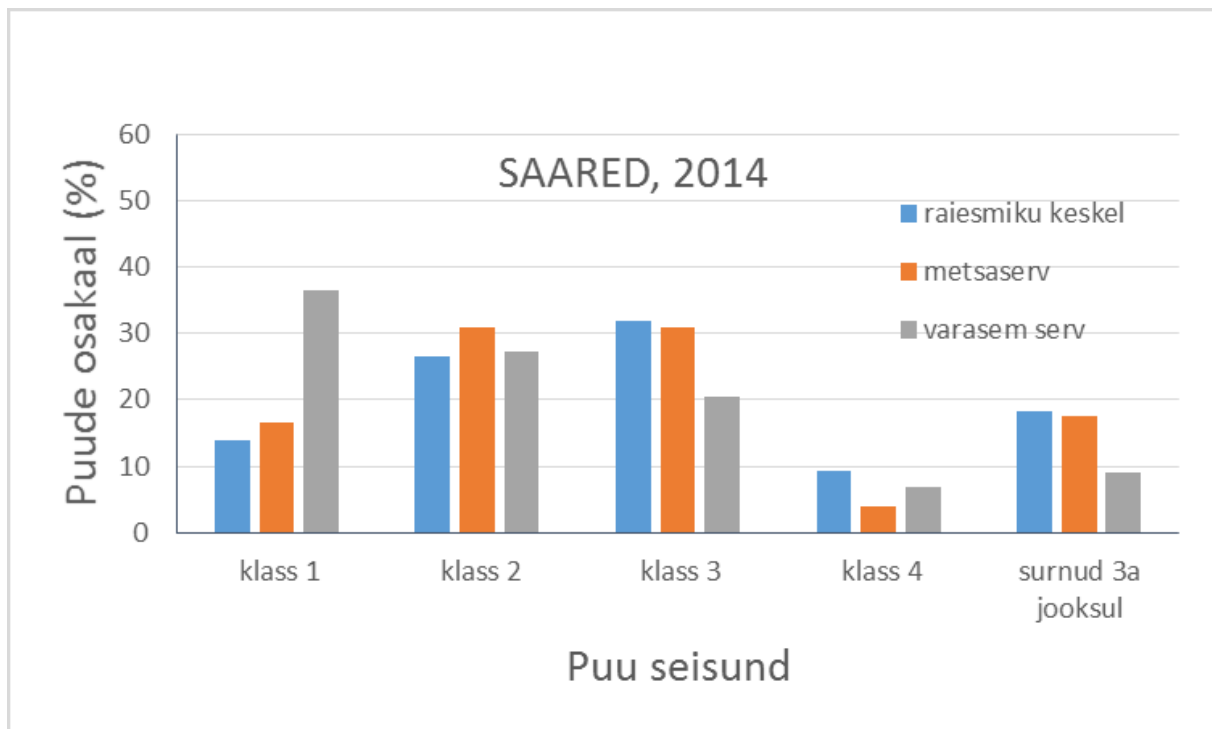
Kokkuvõetuna Eesti kohta on hariliku saare puudest metsas kõige enam surnud puud, koguni 43%, seejärel pooleldi kuivanud võradega ning üksikute kuivanud okstega puud, kummastki klassist peaaegu võrdselt, 21-22%. Täiesti terveks klassifitseeriti ainult 14% analüüsitud puudest. Huvitava asjaoluna selgus, et enam oli külmaseene kahjustusega puud Jõgevamaal, s.h juurekaelalt murdunud puud (vt. Palm ja Mälgi 2014).

Hariliku saare säilikpuude tervisliku seisundi jälgimine lageraielankidel sai alguse 2002. aastal. Esimesi võrakahjustusi täheldati neil 2005. aastal. Aastatel 2009-2014 jälgiti puude võrade seisundit iga-aastaselt. Alates 2009. kuni 2014 aastani oli tervete puude osakaal eluspuude hulgas äärmiselt sarnane (umbes 23%), kuigi eluspuude koguarv vähenes 478-lt 374-le. 2009.a. oli terveid veel 111 puud 478-st, aastal 2014 aga 88 puud 374-st. Kusjuures 57 puud ei omanud mingeid sümptomeid saaresurmast, kuid molekulaarsed meetodid tõestasid,

et kõik puud olid siiski nakatunud. Oluline on märkida, et 2014. aastaks oli tervenunud üks puu, mis 2009. aastal oli arvatud suremise äärel olevaks. Lisaks paranes veel neli puud, mis 2009. ja 2010. aastal arvati haigusklassi „üle poole võra kahjustatud“. Üks puu hinnati 2014. aastal seisundiklassi „üksikud kuivanud oksad“, ehkki 2009.s.-l oli ta kohe suremas. Nagu on näha ka joonistel 3 ja 4, siis nende puude tervislik seisund, kes kasvasid enne raiet puistu avatud servas oli parem kui langi keskel kasvavatel puudel. Metsaserva lähedus enne raiet omab säilikpuudele positiivset efekti peale raiet, kuna ilmselt mikrokliima ja keskkond raiejärgselt muutub vähem kui langi keskosas, seega šokk ja stress puudele on väiksem ning nad on vähem vastuvõtlikud seenpatogeenide suhtes (Rosenvald *et al.* 2015).



Joonis 3. Hariliku saare säilikpuude seisund sõltuvalt nende asendist raiesmikul aastal 2009. Klass 1 – terved puud; klass 2 – mõned oksad surnud; klass 3 – palju oksa surnud; klass 4 – enamus oksa surnud (Rosenvald *et al.* 2015).



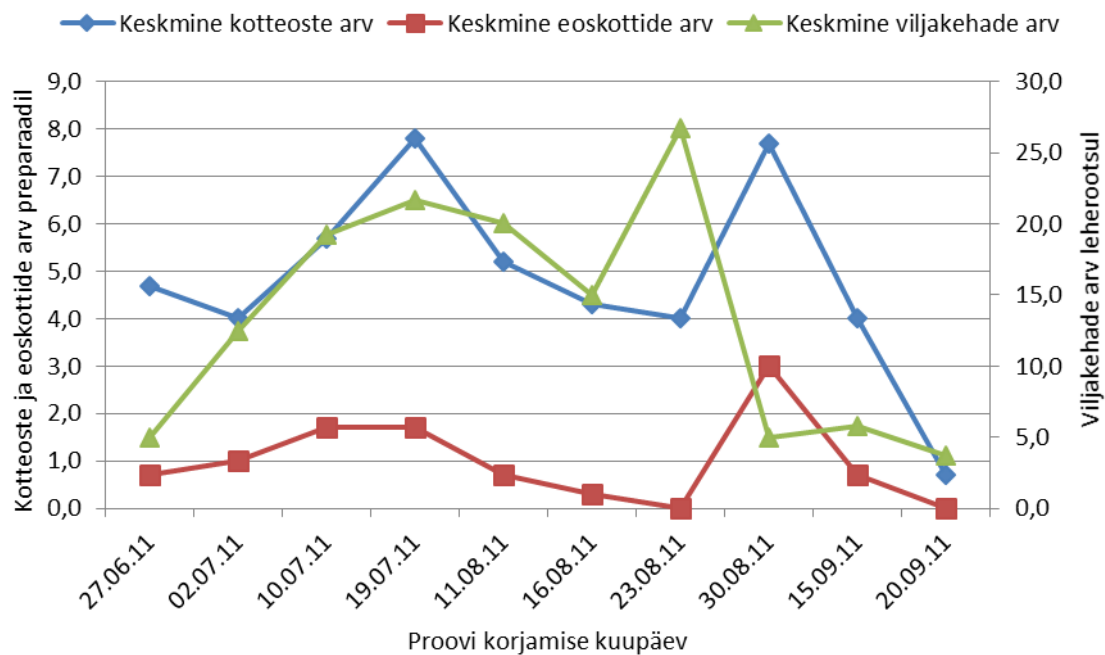
Joonis 4. Hariliku saare säiliku puude seisund sõltuvalt nende asendist raiesmikul aastal 2014. Klass 1 – terved puud; klass 2 – mõned oksad surnud; klass 3 – palju oksid surnud; klass 4 – enamik oksid surnud (Rosenvald et al. 2015).

Molekulaarsed analüüsid puiduproovidest näitasid, et 102-st puust 15 puu tüve puidust leiti *H. fraxineus* ehk tüvepuit oli nakatunud saaresurma tekitajasse. 28 puul tuvastati molekulaarselt *Armillaria* sp. Nakkus, nendest 21% olid väliselt täiesti terved puud. Nakatunud puudel oli enam levinud tutt-külmaseen (*Armillaria cepistipes*) ehk tervelt 17 puul ning ühel juhul tuvastati põhja-külmaseen (*A. borealis*) y-tüüp (vt. lisaks Rosenvald et al. 2015).

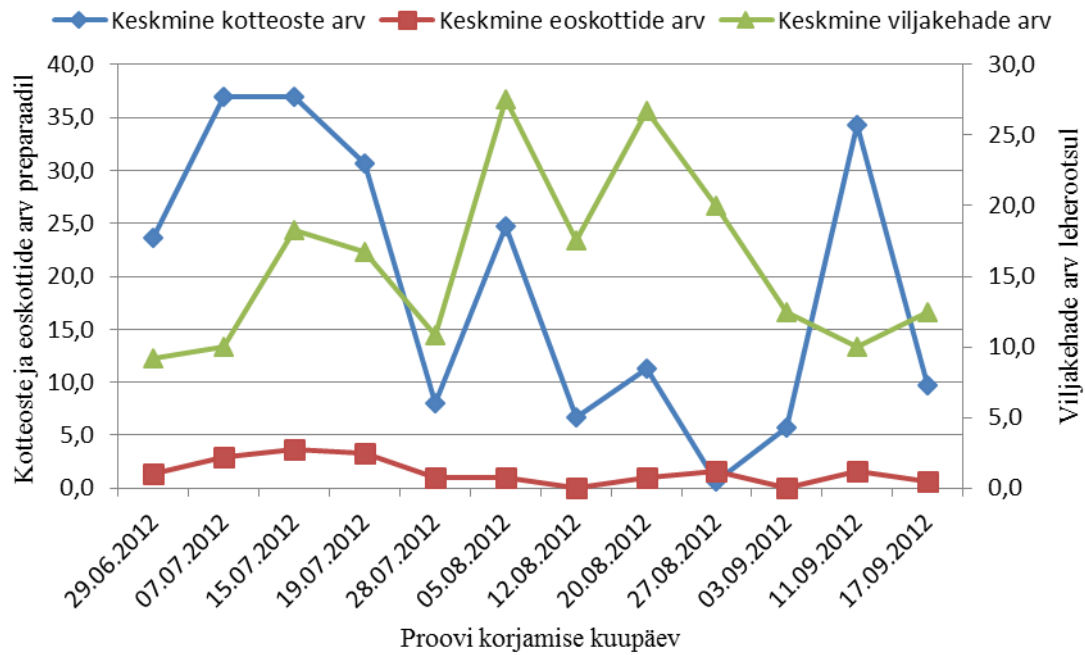
3.1.4. Saaresurma tekitaja sporulatsioon

Nõgiaru püsikatseala kolme aasta (2011-2013) hariliku saare leherootsuldel saaresurma tekitaja esinemise rohkuse uurimiseks võetud proove võrreldes selgub, et eoskottide, kotteoste ja viljakehade arv on suhteliselt erinev (vt joonis 5; 6; 7). 2013. aasta andmetest on näha, et suurele viljakehade arvukusele järgneb loogiliselt mõne aja pärast ka märkimisväärselt suurem eoste hulk, mis ei lange aga kokku sama perioodi viljakehade suurima arvuga. Eriti hästi on see näha 12.07.2013 kogutud proovis, kus viljakehade arv on kõrge aga samal ajal kotteoste arv keskmisega võrreldes on madal. Seevastu 21.07.2013 leherootsuldel esinev viljakehade arv on madal, kuid kotteoste arv on tunduvalt tõusnud. Samasuguseid muutusi võib näha ka 2012. aasta septembrikuu proovide tulemustest.

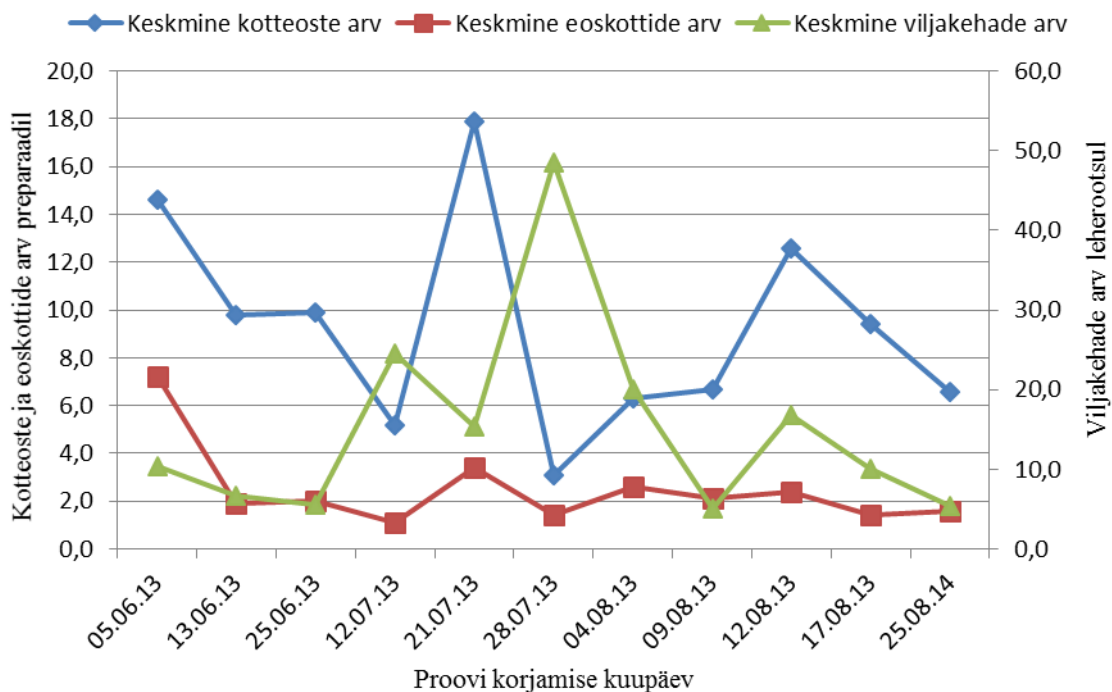
Kõige varasem küpsete viljakehade leid 2013.aastal langes 5. juunile ja hiliseim 25. augustile, 2012. aastal oli kõige varem viljakehi näha 29. juunil ja hiliseimana 17. septembril. 2011. aastal oli kõige varem viljakehi näha 27. juunil ja hiliseimana 20. septembril. Kõige rohkem eoseid on olnud kolme aasta tulemuste põhjal juuli keskpaigast juuli lõpuni. Kõigil kolmel graafikul on näha, et kui viljakehade arv langeb, siis eoskottide arv veidi tõuseb. Kõige rohkem saaresurma tekitaja viljakehi leitud aga juuli lõpust augusti teise pooleni.



Joonis 5. *H. fraxineus*´e keskmine kotteoste, eoskottide ja viljakehade arvukus hariliku saare Nõgiaru püskatsealalt korjatud proovides 2011. aastal.

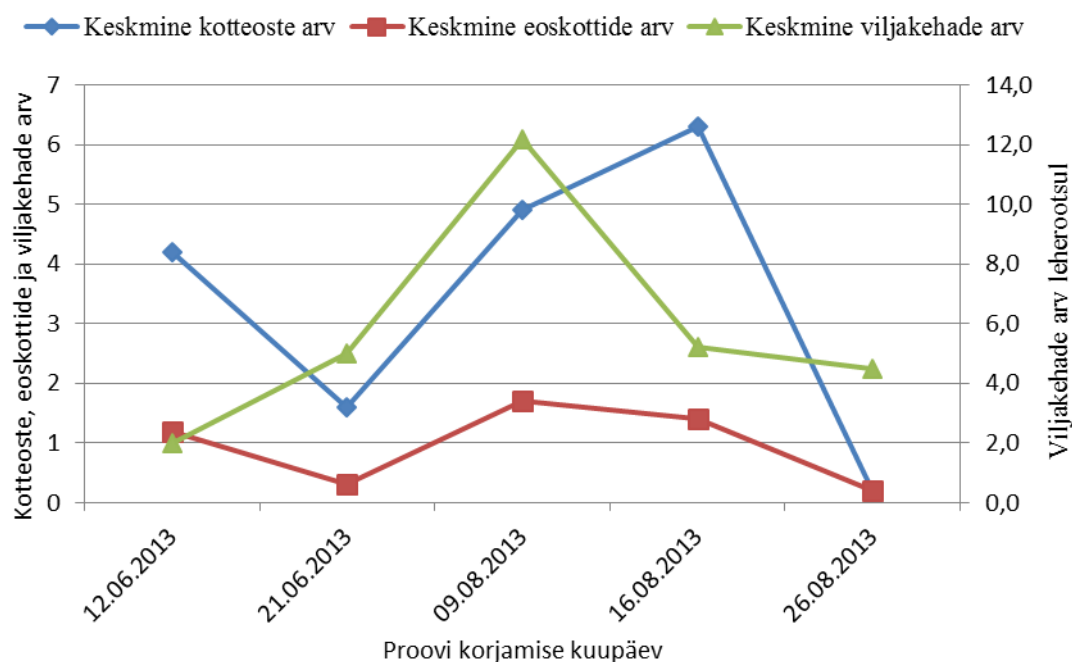


Joonis 6. *H. fraxineus*'e keskmine kotteoste, eoskottide ja viljakehade arvukus Nõgiaru püsikatsealalt korjatud proovidel 2012. aastal harilikul saarel.



Joonis 7. *H. fraxineus*'e keskmine kotteoste, eoskottide ja viljakehade arvukus Nõgiaru püsikatsealalt kogutud proovidel 2013. aastal

Sauresurma tekitaja eoste, eoskottide ja viljakehade arvukuse muutumine Tartus Kreutzwaldi 5 juurest kogutud mandžuuria saare leherootsul on toodud joonisel 8. Kõige suurem kotteoste arvukus oli 16. augustil ja madalaim 26. augustil. Eoskottide arvukus oli madalaim samuti 26. augustil, kuid kõrgeim 9. augustil. Viljakehade arvukus oli kõrgeim 9. augustil ja madalaim 12. juunil.



Joonis 8. *H. fraxineus*'e keskmine kotteoste, eoskottide ja viljakehade arvukus mandžuuria saarel (*Fraxinus mandshurica*) 2013. aastal Tartu, Kreutzwaldi 5 korjatud proovidel.

Kolme aasta kokkuvõttena (2011 kuni 2013) võib välja tuua, et sauresurma tekitaja *H. fraxineus*-i viljakehad esinevad leherootsul sõltuvalt aasta looduslikest tingimustest juuni algusest kuni septembri teise pooleni ehk sel ajal levivad patogeeni eosed. Kõige rohkem sauresurma tekitaja viljakehi leidis aga juuli teisest poolest kuni augusti teise pooleni, samal ajal haigustekitaja eoseid oli enam juulis. See tähendab ilmselt seda, et juuli kuu tingimused on seenele parimad. Erandina oli 2012. aasta septembri algus, kus eoste arv oli oluliselt üle keskmise. Huvitava asjaoluna tuleb märkida seda, et mida varem oli näha viljakehi seda varem ka nende esinemine looduses lõppes ning mida hiljem algas seda hiljem ka viljakehade teke lõppes. Seega, kolme aasta süstemaatiliste proovide kogumise tulemusena Nõgiaru

katsealal selgub, et *H. fraxineus*-i viljakehad tekivad saare leheroodudele maapinnal keskmiselt 81 kuni 85 päeva kestel. Üldjuhul leherootse koguti siis kui neid looduses reaalselt nähti ja ei kogutud, kui neid ei märgatud. Hetke seisuga ei ole näha ühtegi viljakeha hariliku saare leherootsudel Nõgiaru katsealal, s.o aruande koostamise ajaks 12. juuni 2015 (Rein Drenkhan'i suulised andmed).

Sauresurma tekitajate eoste sporulatsiooni hinnati, et mõista seene eoste levikut või leviku strateegiat. Sporulatsiooni ehk eoste produktsiooni tuleb analüüsida kõikide uustulnukate puhul, seda ka *H. fraxineuse*'l. Sporulatsiooni hinnangud annavad teada aja millal eosed levivad ehk mis ajal on võimalik patogeeni tõrjuda. Seega, kui soovida sauresurma nakatumise aktiivsust pidurada siis tuleb alustada patogeenile sobivast substraadist ehk leherootsudest. Kui keemiline tõrje vajadus peaks tekkima siis põhimõtteliselt tuleks alustada seda tegevust juuni algusest, et suruda maha seene viljakehade teke. Loomulikult tuleb mõista, et keemiline tõrje on siiski võimalik vaid piiratud alal, s.o nt taimla või piiratud alal olev puude kollektsioon. Teine alternatiiv on leherootsude ehk seenele sobiva substraadi eemaldamine, s.o koristamine ja põletamine.

Kolmel erineval aastal hinnati sporulatsiooni seetõttu, et vältida ühe aasta juhuslikkust. Erinevatel peremeestaimede sporulatsiooni hinnangud aitavad mõista, kas seene käitumine võib sõltuda peremeestaimest. Viimase erinevust me hetke analüüside tulemusena väita ei saa.

3.2. Sauresurma võimalik introduksioon Eestisse

Suureks probleemiks Euroopas on kujunenud arusaama puudumine, mil viisil kust, ja miks on sauresurma tekitav seen Euroopasse saabunud. Selle küsimuse lahendamise annaks palju mõistmaks neid levimisteid ja –viise, mille abil ja kaudu võivad meile saabuda teisedki invasiivsed patogeenid.

Alul Kesk-Euroopast lähtunud hüpotees, et *H. fraxineus* pärineb Ida-Aasiast, leidis peagi DNA uuringutega Jaapanis kinnitust: Kaug-Ida saareliik mandžuuria saar (*Fraxinus mandshurica*) on see peremeestaim, millel on aegade hämarusest lähtuvalt nimetatud seen välja arenenud ja millele ta pika kooselu vältel sedavõrd on kohastunud – ja vastupidi – et ta sellele saareliigile enam olulist kahju ei tee. Kuidas aga *H. fraxineus* pääses kõige äärmisest, Aasia idapoolseimast servast Euroopasse?

Selleks on mitu võimalust:

- a) Mandžuuria saare introduktsiooni käigus puuliigi salajase kaaslasena (vt. Drenkhan et al., 2014).
- b) Vaikset ookeani Aasia idarannikult kuni Atlandi ookeaniga Euroopa läänerannikul ühendavat “Krüssmanni silda” (orig. termin) mööda. Selleks on katkematu sa 20 erineva saareliigi areaalide ahel läbi Ida-, Kesk- ja Lääne-Aasia, läbi Ida-, Kesk- ja Lääne-Euroopa. Kitsaima kohaga Kesk-Aasias (vt. Drenkhan et al., 2015).
- c) Seen polegi kusagilt äsja tulnud, ta on “kogu aja” Euroopas vaikselt pesitsenud, ja alles mingid keskkonnas toimunud muutused – soodsad seenele, kahjulikud saarele, on põhjustanud tema varjust ülestõusmise ja epideemia vallandamise. Mis tähendab aga see “kogu aja”? Ja siin läheb asi põnevaks: nimelt pärinevad saarepuud Euroopas Põhja-Ameerika mandrilt, kust nad oligotseenis Põhja-Ameerikat ja Ida-Aasiat ühendavat “mandrite-silda hakkasid alul Aasiat ja siis Euroopat asustama. Miks mitte ei võinud ka *H. fraxineus* juba tollal Euroopasse jõuda!?

Nendest versioonidest töötati aruandeperioodil põhjalikult läbi esimene, s.o. mandžuuria saare kaaslasena saabumise versioon. Teiste versioonidega tuleb veel tööd teha.

3.2.1. Mandžuuria saare (*Fraxinus mandshurica*) introduktsioon ja seosed saaresurmaga

Vastavat versiooni käsitleb põhjalikult meie sulest tipp-ajakirjas “European Journal of Forest Research” äsja ilmunud artikkel (vt. Drenkhan et al. 2014) ja seepärast me seda siinkohal pikemalt ei esita. Lühidalt: ehkki teoreetiline tõenäosus saaresurma ilmunise kohta Euroopasse introduktsiooni teel on väga suur, ei õnnestunud meil ei ajaliselt (19. sajandi keskpaigast tänaseni) ega ruumiliselt (puhang algas Eestis piirkonnast, kuhu mandžuuria saart on kõige vähem introdutseeritud) neid seostada. Liiga palju on veel segavaid argumente! Mis aga ei takistanud meie uurimistulemusi kokkuvõtvat artiklit nii kõrgetasemelises teadusajakirjas avaldada!

3.2.2. Sauresurm herbaareksemplaridel

EMÜ rahvusvahelisest mükoloogilisest kogust pärinevaid proove analüüsiti kokku 13, s.o saare leherootse koos *Hymenoscyphus* sp. viljakehadega, nende esialgne määrang oli *Hymenoscyphus albidus*. Proovid pärinesid alates 1997. aastast Eestist ja üks proov Leedust 1966. aastast. Kõik Eesti proovid osutusid molekulaaranalüüside tulemusena sauresurma tekitajateks *Hymenoscyphus fraxineus* ning Leedu proov oli *H. albidus*. Reaalselt on Eesti territooriumilt kogutud esimesed sauresurma tekitajad viljakehad aastast 1997. Sellest analüüsist selgub, et saprotroofset seent *Hymenoscyphus albidus*'t ei ole senini õnnestunud Eestist leida.

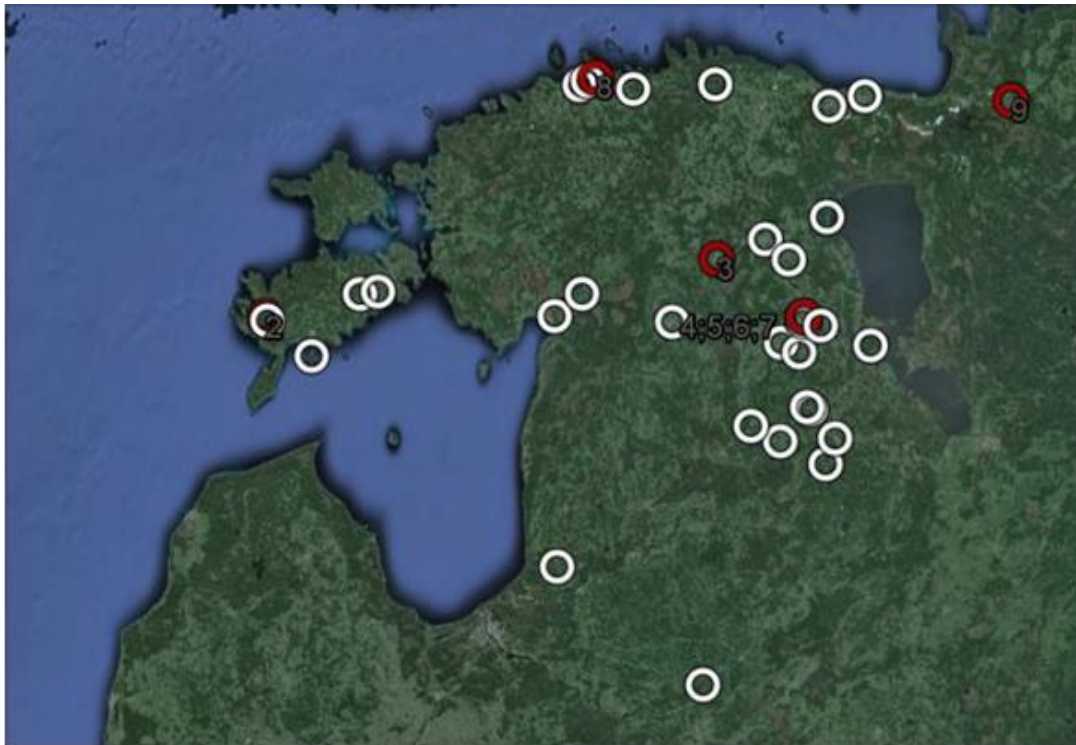
H. fraxineus'e liigspetsiifiliste praimeritega tehtud DNA analüüs erinevate saare liikide herbaareksemplaridele (s.o lehed, leherootsud ja võrsed) ja korduvate analüüside tulemusena osutusid positiivseks üheksa proovi (tabel 4). Milledest 8 oli korjatud ajavahemikul 1959-1976, üks saare positiivne proov pärines 19. sajandi lõpust, s.o 1898. aastast. Positiivseks osutunud proovide väikest arvu saab põhjendada herbaarmaterjalide vanusega ning paljudel neist eksemplaridest võis seene DNA olla juba liialt degradeerunud.

Järgnevale kaardile (joonis 9) on märgitud herbaareksemplaride korjamispiirkonnad, positiivseks osutunud proovidega piirkonnad on märgitud punasega.



Joonis 9. Euroopast kogutud herbaareksemplaride korjamispiirkonnad. Punased tähised näitavad sauresurma tekitajaga nakatunud proove (*Baaskaart*: Google Earth 2015).

Järgnevale kaardile (Joonis 10) on kantud Läänemere piirkonnast kogutud herbaareksplaride korjamispiirkonnad. Positiivsete proovide numbrid pärinevad tabelist 4.



Joonis 10. Läänemere ümbrusest korjatud herbaareksplaride korjamispiirkonnad. Punased tähised näitavad saaresurma tekitajaga nakatunud proove (Baaskaart: Google Earth 2015).

Üks positiivseks osutunud korjamispiirkond asetseb Tartus Raadil, sealt korjatud herbaareksplaride seas oli positiivseid proove koguni neli. Üks positiivse prooviga piirkond oli ka Saaremaa Viidumäe looduskaitseala. Harjumaal positiivseks osutunud korjamispiirkond oli Tallinna Botaanikaia dendraarium. Jõgevamaalt korjatud positiivne proov pärines Põltsamaalt ning vahetult Eesti piiri tagant korjatud proov Kingissepast, Venemaalt. Vanim korjatud proov pärines Prantsusmaalt Arnos linnast.

Tabelis 4 on antud ülevaade *H. fraxineus* 'ega nakatunud hebaareksplaridest. Nagu tabelist selgub, on kõik üheksa proovi korjatud Euroopast ning nende seas on nii Euroopa mõistes eksootpuuliike kui ka Euroopas looduslikult esinevaid liike. Enamusel positiivseks osutunud proovidega herbaareksplaridel olid nähtavad, kas lehtede värvuse muutused, või leheservade pruunistumine ja kärbumine (vt Agan, 2015).

Tabel 4. Liigispetsiifilise PCR analüüsi tulemused *H. fraxineus* DNA praimeriga (vt. joonised 9 ja 10). Analüüs on tehtud kõikidele proovidele kahes korduses. Tartust Raadilt sama kuupäevaga korjatud pensilvaania saarte puhul on tegemist erinevate proovidega (vt. Agan, 2015).

| Jrk nr. | Liigi nimi Eesti keeles | Liigi nimi ladina keeles | Korjamise asukoht herbaarlehel | Korjamise kuupäev | <i>H. fraxineus</i> liigispetsiifiline PCR analüüs (Riit <i>et al.</i> 2014) |
|---------|-------------------------|---|-------------------------------------|-------------------|--|
| 1. | Ahtalehise saare vorm | <i>Fraxinus angustifolia</i> subsp. <i>Oxycarpa</i> | Prantsusmaa, Arnos | 15.09.1898 | Positiivne |
| 2. | Harilik saar | <i>Fraxinus excelsior</i> | Viidumäe looduskaitseala, Saaremaal | 21.09.1959 | Positiivne |
| 3. | Lihtlehine saar | <i>Fraxinus excelsior</i> var. <i>Diversifolia</i> | Põltsamaa | 11.07.1961 | Positiivne |
| 4. | Pensilvaania saar | <i>Fraxinus pennsylvanica</i> | Tartu, Raadi park | 16.07.1973 | Positiivne |
| 5. | Pensilvaania saar | <i>F. pennsylvanica</i> | Tartu, Raadi park | 16.07.1973 | Positiivne |
| 6. | Pensilvaania saar | <i>F. pennsylvanica</i> | Tartu, Raadi park | 16.07.1973 | Positiivne |
| 7. | Pensilvaania saar | <i>F. pennsylvanica</i> | Tartu, Raadi park | 16.07.1973 | Positiivne |
| 8. | Pensilvaania saar | <i>F. pennsylvanica</i> | Tallinna Botaanikaaed dendraarium | 20.09.1976 | Positiivne |
| 9. | Jõgisaar | <i>F. potamophila</i> | Kingissepp, Viidu park, Venemaa | 10.08.1968 | Positiivne |

3.2.3. Haigusproovide esmaanalüüs Venemaa Kaug-Idast

Puhaskultuuri meetodil õnnestus laboris välja kasvatada Kaug-Idast ekspeditsioonilt toodud mandžuuria saare võrsetelt mõned kultuurid. Proovide sekveneerimise järel määrati puidult, leheroodudelt ja võrsetelt järgmiste seeneliikide esinemine:

Botryosphaeria dothidea (99% sarnasus rahvusvahelise GenBank andmetel),

Paraconiothyrium brasiliense (99%),

Eutypa erinevad liigid (97%),

Dothiorella sp. (100%),

Phomopsis sp. (99%),

Paraconiothyrium variabile (94%).

DNA analüüside järel määrati patogeense *H. fraxineus* esinemine *F. mandzchurica* lehtede, võrsete ja seemnete proovidest. See tulemus kinnitab tõsiasja, et saaresurma tekitajat on võimalik levitada ka seemnetega.

Saprotroofset *H. albidus*'t ei õnnestunud tuvastada ühestki Venemaa Kaug-Ida proovist.

3.3. Saareseemne kogumine ja analüüs

3.3.1. Kogutud saare seeme ja katseala rajamise plaanid

Saare seeme on kogutud vastavalt peatükis 2.1.4. kirjeldatule eesmärgiga rajada kaks sarnast katseala Tartumaale Järveljale. Kaks katseala, s.o ala suurusega 0,5 ha ja seaduga 2 x 2 meetrit. Seega on arvutuslik vajadus kokku 2500 taime. Metoodika järgi tuleks istutada 40 hariliku saare partiid (seemned 40. emapuult) ja võimalusel kolm eksootsaare partiid – hiina, pensilvaania ja mandžuuria taimed. Hiina saare seemnest moodustub üks taimede partii ehk erinevate emapuude seeme segatakse kokku. Ülejäänud partiid on sellised, et partii tähendab ühe emapuu järglasi. Seega on arvutuslik taimede vajadus partii kohta 58. Kõik peab katsete planeerimise juures olema arvestatud varuga. Plaani järgi pannakse katsekultuuri kasvama viiest maakonnast pärit nelja välistunnuste põhjal terve ja nelja välistunnuste põhjal haige emapuu järglased. Siit ka eelnevalt mainitud number 40: 8 puud maakonna kohta, viis maakonda. Kuna meil pole seemnete idanevuse (kvaliteedi kohta) midagi teada, siis loodame, et 80% juhtudest võiks külv õnnestuda. Ja külvi võiks teha nii, et partii kohta oleks soovitud taimede arv ca 100 – arvutusliku vajadusega võrreldes oleks siis 42 taime varuks. Selline puhver oleks hea vähemalt kolmel põhjusel: 1) kui idanevus ei ole hea, siis on suurem tõenäosus vajalik arv taimi ikkagi kätte saada; 2) üle jäävad taimed jäävad veel vähemalt aastaks kättesaadavasse kuid kaitstud kohta alles – kui kultuuris esimese aastaga midagi välja läheb, siis saab asendada; 3) lisaks tuleb mõned taimed kasutada nakatamiskatseteks, et kontrollida haigusele vastuvõtlikkust.

Kui esimese külviga (sel aastal) ikkagi vajalikku hulka taimi ja partiisid ei saa, siis teeme järgmisel aastal uue külvi. Selleks on seemet kogutud varuga.

3.3.2. Seemnetega tehtud analüüsid

Seemnete DNA analüüsi tulemused näitasid seda, et *H. fraxineus*'e liigispetsiifilise praimeriga (Riit *et al.* 2014) tehtud testide tulemusena osutusid positiivseks kolmelt puult korjatud seemnete proovid. *H. albiduse* liigispetsiifiliste praimeritega tehtud analüüsi tulemused olid negatiivsed, mis tähendab, et kolm positiivset proovi olid nakatunud *H. fraxineus*'ega, ning neil ei esinenud *H. albiduse* DNAd. Kuna kogu seemneanalüüsi kaasatud puude arv oli 22, siis saaresurmaga nakatunud puude osakaal oli kogu valimist ca 14 %. Kõigi kolme nakatunud puu puhul oli tegemist hariliku saarega (*Fraxinus excelsior*). Positiivsetest proovidest kaks olid korjatud Tartumaalt Vedult 29. septembril 2014. aastal. *H. fraxineus*'ega nakatunud olid nii väliselt terve puu seemned, kui ka väliselt haige puu seemned. Kolmas positiivne proov oli korjatud Järvamaalt 16. jaanuaril 2015. aastal, tegemist oli seemnetega, mis olid korjatud haigelt puult. Antud tulemused kinnitavad seda, et seemnetega on võimalik saaresurma transportida ühest geograafilisest punktist teise, samuti näitavad tulemused seda, et haigustunnusteta puul ei pruugi olla haigusevabasisid seemneid. Oluline on märkida lisaks, et haigussümptomitega puude seemned ei pruugi olla alati saaresurma tekitajaga nakatunud (vt. Agan, 2015). Seemnete analüüs oli vajalik edaspidise analüüsi tarvis, kus kontrollitakse nakatunud seemnetega kasvatatud saarte taimede haigusesse nakatumist.

3.4. Majandamissoovitused saaresurma vastu

Seemned ja seemnete transport ning tõrjevõimalused taimlas

Saare seemned on potentsiaalsed haiguse levitajad. Väliselt terved puud ei tähenda seda, et seemned on haiguse tekitajast priid ning teisalt haiged puud ei pruugi tähendada seda, et seemned oleks alati nakatunud. Seega, igasuguse saare seemne materjali transport on potentsiaalne oht. Seepärast on soovitus igasugused saare seemneid tuleb haiguse leviku tõkestamise eesmärgil eelnevalt testida.

Kui on eriline vajadus tuua hariliku saare taimi Eestisse ja neid müüa siis saaresurma tekitaja (*H. fraxineus*) nakkusohu minimeerimisel ja haiguse leviku tõkestamisel oleks alljärgnevad soovitused. Saaresurma nakkusest vabanemiseks tuleks taimi hoida 36°C vees kuni 5 tundi. Hariliku saare taimed taluvad temperatuuri isegi kuni 40°C (vt lisaks Hauptman *et al.* 2013). Teiste saareliikide kohta pole teada, kuidas kuum vesi neile mõjub. Nimetatud tõrjevõtte ei

välista hilisemat taimede nakatumist metsas või haljasalal, kuid see minimeerib haiguse tekitaja levitamist inimese poolt.

Sporulatsioon ja selle järgi tõrje võimalused

Sauresurma tekitajate eoste sporulatsiooni hinnatakse, et mõista seene eoste levikut või leviku strateegiat. Sporulatsiooni hinnangud annavad informatsiooni, millal seene eosed levivad ja millisel perioodil oleks vajalik teostada patogeeni tõrjet. Seene viljakehad asuvad saare leherootsul. Seega, kui soovida sauresurma nakatumise aktiivsust pidurada siis tuleks leherootsud ehk seenele sobiv substraat eemaldada koristamise või põletamise teel. Kui teostada keemilist tõrjet, siis tuleks alustada juba vähemalt juunikuu algusest (periood, mil seene eosed võivad levima hakata), et suruda maha seene viljakehade teke. Keemiline tõrje on siiski võimalik vaid piiratud alal, s.o. nt. taimla või piiratud alal olev puude kollektsioon.

Kas eelistada harilikku saart teistele liikidele? Soovitused edasiseks tegevuseks

Parimat tulemust näitasid mitmed eksootliigid, nt *F. pennsylvanica* ja *F. mandshurica*. Neid võib mõõdukalt, eelkõige haljasaladel ikka kasutada, kuid päris hariliku saart nendega asendada pole mõistlik.

Hetkel kõige õigem käitumisviis on resistentsemate saarekloonide otsingud, läbi nakatamiskatsete ja katsekultuuride rajamise. Nende töödega on käesoleva projekti tulemusena algus tehtud.

Metsamajandamise võimalused sauresurma tõrjel või saarte säilitamisel

Metsamajandamise võimalusi on vähe. Üks võimalus on avatud maastikus saarte säilitamine või avatud metsaservades olevate puude säilitamine. Üldiselt, mida tihedam on saarepuistu seda haigemad saared kipuvad olema.

KOKKUVÕTE

Hetke analüüside tulemusena ei ole hariliku saare seinsund kiita, sest kolme maakonna võrdlusanalüüsi tulemusena on tervete puude osakaal vaid 14% analüüsitud puudest. Säilikpuude analüüsi tulemusena selgub, et haigus kulg on selgelt progresseeruv ehk tervete puude osakaal on kahanenud viie aastaga 111 puult 88 puule. 102 hariliku saare analüüsi tulemusena ja erinevate haigusklassidega puudest tuvastati juuremädaniku tekitaja

külmaseene (*Armillaria* sp.) olemasolu. Millest selgus, et ca kolmandik hinnatud puudest olid nakatunud külmaseene poolt ning enam levinud oli tutt-külmaseen (*Armillaria cepistipes*). Külmaseen mõjutab saarte tervislikku seisundit veelgi.

Kolme maakonna proovialade kokkuvõttena selgub, et Eestis on haiget ja tervet hariliku saare looduslikku uuendust ligikaudu võrdselt, vastavalt 47% ja 51%. See tähendab seda, et looduslik uuendus ei ole haigusest prii ning looduses ei ole veel tekkinud haiguse suhtes resistentseid tüvesid. Kehvemas seisus saare looduslik uuendus oli Läänemaal ja parim Jõgevamaal.

Kolme aasta kokkuvõttena (2011 kuni 2013) võib välja tuua, et saaresurma tekitaja *H. fraxineus*-i viljakehad esinevad leherootsuldel sõltuvalt aasta looduslikest tingimustest juuni algusest kuni septembri teise pooleni ehk sel ajal levivad patogeeni eosed. Kõige rohkem saaresurma tekitaja viljakehi leidis aga juuli teisest poolest kuni augusti teise pooleni, samal ajal haigustekitaja eoseid oli enam juulis. See tähendab ilmselt seda, et juuli kuu tingimused on seenele parimad. Seega, kolme aasta süstemaatiliste proovide kogumise tulemusena Nõgiaru katsealal selgub, et *H. fraxineus*-i viljakehad tekivad saare leheroodudele maapinnal keskmiselt 81 kuni 85 päeva kestel.

Alul Kesk-Euroopast lähtunud hüpotees, et *H. fraxineus* pärineb Ida-Aasiast, leidis peagi DNA uuringutega Jaapanis kinnitust. Seda kinnitavad ka meie poolt kogutud proovid Kaug-Idast. Kuid otsest seost varasema saare liikide introduktsiooni ja haiguspuhangute vahel ei õnnestunud tuvastada. Saaresurm õnnestus tuvastada Kesk-Aasia päritolu saarelt *Fraxinus sogdiana*.

Saare herbaareksemplare uurides selgub, et saaresurma tekitaja *H. fraxineus* on olnud Eestis ja seega ka Euroopas oluliselt varajasem asukas kui see on hetkel teada.

Saare seemned on potentsiaalsed haiguse levitajad. Väliselt terved puud ei tähenda seda, et seemned on haiguse tekitajast priid ning teisalt haiged puud ei pruugi tähendada seda, et seemned oleks alati nakatunud. Seega, igasuguse saare seemne materjali transport on potentsiaalne oht.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Agan, A.** 2015. Saaresurma (*Hymenoscyphus fraxineus*) otsingud saare liikide (*Fraxinus* spp.) herbaareksemplaridelt. Magistritöö. Eesti Maaülikool, 36 lk + lisad.
- Drenkhan, R., Adamson, K., Hanso, M.** 2015. *Fraxinus sogdiana*, a Central Asian ash species, is susceptible to *Hymenoscyphus fraxineus*. *Plant Protection Science*, DOI: 89/2014-PPS, vt. <http://www.agriculturejournals.cz/web/pps.htm?type=futureArticles>
- Drenkhan, R., Adamson, K., Jürimaa, K., Hanso, M.** 2014. *Dothistroma septosporum* on firs (*Abies* spp.) in the northern Baltics. – *Forest Pathology*. Vol. 44, No. 3, pp. 250- 254.
- Gardes, M., Bruns, T. D.** 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. – *Molecular Ecology*. Vol. 2, No. 2, pp. 113-118.
- Hauptman, T., Piškur, B., de Groot, M., Ogris, N., Ferlan, M., and Jurc, D.** 2013. Temperature effect on *Chalara fraxinea*: heat treatment of saplings as a possible disease control method. *For. Pathol.* 43(5): 360–370.
- Palm, K., Mälgi, M.** 2014. Hariliku saare (*Fraxinus excelsior*) seisundi hinnang 5 aastat pärast saaresurma tekitaja (*Hymenoscyphus pseudoalbidus*) esmaavastamist Eestis. Bakalaureusetöö. Eesti Maaülikool, 46 lk + lisad.
- Rosenvald, R., Drenkhan, R., Riit, T., Lõhmus, A.** 2015. Towards silvicultural mitigation of the European ash (*Fraxinus excelsior* L.) dieback: the importance of acclimated trees in retention forestry. *Canadian Journal of Forest Research*. Accepted
- Riit, T.** 2014. PCR praimerid taimede seenpatogeenide tuvastamiseks. (Magistritöö). Tartu Ülikooli Loodus- ja Tehnoloogiateaduskond, Molekulaar- ja Rakubioloogia instituut. Tartu.
- Tee, M.** 2014. Eksoot-saareliikide (*Fraxinus* spp.) tervislik seisnund ning seente mitmekesisus saareliikide lehestikus. Magistritöö. Eesti Maaülikool, 68 lk + lisad.
- White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S., Taylor, J.** (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH. (eds). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press: London. pp. 315 – 322.

<http://natarc.ut.ee/seenekogud.php>

LISAD

Lisa 1. Teemakohased artiklid

Drenkhan, R., Sander, H., & Hanso, M. 2014. Introduction of Mandshurian ash (*Fraxinus mandshurica* Rupr.) to Estonia: Is it related to the current epidemic on European ash (*F. excelsior* L.)?. *European journal of forest research*, 133(5), 769-781. (vt. <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10342-014-0811-9>).

Drenkhan, R., Adamson, K., Hanso, M. 2015. *Fraxinus sogdiana*, a Central Asian ash species, is susceptible to *Hymenoscyphus fraxineus*. *Plant Protection Science*, DOI: 89/2014-PPS (vt. <http://www.agriculturejournals.cz/web/pps.htm?type=futureArticles>).

Rosenvald, R., Drenkhan, R., Riit, T., Lohmus, A. 2015. Towards silvicultural mitigation of the European ash (*Fraxinus excelsior* L.) dieback: the importance of acclimated trees in retention forestry. *Canadian Journal of Forest Research*, DOI: 10.1139/cjfr-2014-0512, avaldatud webis (<http://www.nrcresearchpress.com/journal/cjfr>).

Drenkhan, R., Riit, T., Adamson, K., Hanso, M. 2015. The earliest samples of *Hymenoscyphus albidus* vs. *H. fraxineus* in Estonian herbaria and the development of new species-specific PCR primers. Käsikiri valmis ajakirjale saatmiseks.

Lisa 2. Teemakohased lõputööd

Palm, K., Mälgi, M. 2014. Hariliku saare (*Fraxinus excelsior*) seisundi hinnang 5 aastat pärast saaresurma tekitaja (*Hymenoscyphus pseudoalbidus*) esmaavastamist Eestis. Bakalaureusetöö. Eesti Maaülikool, 49 lk + lisad.

Tee, M. 2014. Esoot-saareliikide (*Fraxinus spp.*) tervisliku seisund ning seente mitmekesisus saareliikide lehestikus. Magistritöö. Eesti Maaülikool, 70 lk + lisad.

Agan, A. 2015. Saaresurma (*Hymenoscyphus fraxineus*) otsingud saare liikide (*Fraxinus spp.*) herbaareksemplaridelt. Magistritöö. Eesti Maaülikool, 36 lk + lisad.

Lisa 3. Teemakohased ettekanded

Drenkhan, T., Drenkhan, R. 2013. Saaresurmast Eestis ja mujal Euroopas. ELUS-i metsandusseksiooni koosolek, 13.02.2013, Tartu.

Drenkhan, R., Drenkhan, T. 2013. Seasonality of apothecia and ascospores of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* in Estonia. COST FRAXBACK seminar, 04.-06.09.2013, Rootsi, Malmö, posterettekanne.

Drenkhan, R. 2014. Invasiivsed haigused ohuks meie metsadele. 08.01.2014 Kolmapäevaõhtute sari. Tartu, Eesti.

Adamson, K. 2014. Uusi arenguid invasiivsete puuhaiguste uuringutes Eestis. 13.12.2014 Eesti Mükoloogiaühingu aastakoosolek Actiones. Tartu, Eesti.

Drenkhan, R. 2015. Mis on saaresurm ja miks see on oluline? Uut informatsiooni invasiivsest haigusest saaresurm. Saaresurma seminar, 22.01.2015., Eesti Maaülikooli metsamaja, Tartu.

Rosenvald, R., Drenkhan, R., Riit, T., Lõhmus, A. Saared säilikpuudena: kas võimalus saaresurma vastu võitlemisel? Uut informatsiooni invasiivsest haigusest saaresurm. Saaresurma seminar, 22.01.2015., Eesti Maaülikooli metsamaja, Tartu.

Hanso, M. 2015. Jäljekütid saaresurma jälgi ajamas. Uut informatsiooni invasiivsest haigusest saaresurm. Saaresurma seminar, 22.01.2015., Eesti Maaülikooli metsamaja, Tartu.

Riit, T. 2015. Patogeenide molekulaarne diagnostika. Uut informatsiooni invasiivsest haigusest saaresurm. Saaresurma seminar, 22.01.2015., Eesti Maaülikooli metsamaja, Tartu.

Maaten, T. 2015. Saare plaanitavast katsealast Järveljal. Miks ja milleks? Uut informatsiooni invasiivsest haigusest saaresurm. Saaresurma seminar, 22.01.2015., Eesti Maaülikooli metsamaja, Tartu.

Lisa 4. Teemakohased intervjuud ja e-kirjad

Metsahaigustest üldiselt, saates Kukuv Õun, KUKU RAADIO, 3.08.2014, dotsent Rein Drenkhan

Vikerraadio – intervjuu Saaresurma seminari 22.01.2015 järel.

Lisa 5. Saaresurma seminari 22.01.2015 osalejate nimekiri



SEMINAR „Uut informatsiooni invasiivsest haigusest saaresurm“

22.01.2015, Kreutzwaldi 5, Tartu

| | Nimi | asutus | kontakt |
|----|--------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| 1 | Ave Post | Põllemaja pandusamet | ave.post@pma-angra.ee |
| 2 | Ragna Toom | Põllemaja pandusamet | ragna.toom@pma-angra.ee |
| 3 | Kadi-Ly Puidma | Ensi Nõuandekeskus | kadi.ly.puidma@ohaid.com |
| 4 | HEIKO ARM | RMK | Heiko.Arm@rmk.ee |
| 5 | Aivar Aru | Ensi Nõuandekeskus | aivar.aru@ohaid.com |
| 6 | Olav Mäeväl | Keskkoostamisamet | olav.maeval@keskkoostamis.ee |
| 7 | Arvan Toom | Ensi Nõuandekeskus | arvan.toom@ohaid.com |
| 8 | Arvan Paal | RMK | arvan.paal@rmk.ee |
| 9 | Tea Tullus | EMU | tea.tullus@emu.ee |
| 10 | Taru Toom | Keskkoostamisamet | taru.toom@keskkoostamis.ee |
| 11 | Peep Ahold | Olumäe MK | peep.ahold@olumaeki.ee |
| 12 | Ave Sadam | KAM Pärnu-Viljandi | ave.sadam@keskkoostamis.ee |
| 13 | Mihkel Luige | KAM Pärnu-Viljandi | mihkel.luige@keskkoostamis.ee |
| 14 | Kristina Kool | Keskkoostamisamet Toompea-Toru | kristina.kool@keskkoostamis.ee |
| 15 | Pille Kairne | KeA Nõuandekeskus Saaremaa | pille.kairne@keskkoostamis.ee |
| 16 | Andrus Hendrikson | KeA Põlvamaa | andrus.hendrikson@keskkoostamis.ee |
| 17 | Hanno Tamm | KAUK | hanno.tamm@kauk.ee |
| 18 | Epp Pilt | KAUK | epp.pilt@kauk.ee |
| 19 | Helmi Oja | Toompea LHA | helmi.oja@toompea.ee |
| 20 | Katrin Vorkpaev | EMU | katrin.vorkpaev@emu.ee |
| 21 | Marek Metslaid | EMU | marek.metslaid@emu.ee |
| 22 | Peter Murd | EMU | peter.murd@emu.ee |
| 23 | Juku Paluots | EMU | juku.paluots@emu.ee |
| 24 | Bella Keelmaa | EMU | bella.keelmaa@gmail.com |
| 25 | Vello Lepp | EMU | vello.lepp@emu.ee |
| 26 | AHTO AOK | EMU | ahto.aok@hokkari.com |
| 27 | Mikko Mäe | EMU | mikko.mae@emu.ee |
| 28 | Enn Aas | EMU | enn.aas@emu.ee |
| 29 | OLEV AASER | TALINNA BOSTANIKAE | olev.aaser@bostanikae.ee |
| 30 | Evelin Tamm | EMU | evelin.tamm@emu.ee |
| 31 | Jüri Lohu | RMK | juri.lohu@rmk.ee |
| 32 | MART KESKMAA | Ensi Nõuandekeskus | mart.keskmaa@ohaid.com |
| 33 | Siimo Silland | Ensi Nõuandekeskus | siimo.silland@ohaid.com |
| 34 | Kaido Adamson | EMU | kaido.adamson@emu.ee |
| 35 | Aveliina Kivip | EMU | aveliina.kivip@emu.ee |
| 36 | Ashalden | ARBOREST OÜ | ashalden@arborrest.com |
| 37 | Toomas Skelava | ARBOREST OÜ | toomas.skelava@arborrest.com |
| 38 | Sergei Vorkpaev | ARBOREST OÜ | Sergei.Vorkpaev@gmail.com |
| 39 | Heiki Hanso | ARBOREST OÜ | heidihanso@gmail.com |
| 40 | Martti Lohu | HAYASTAJA OÜ | martti.lohu@gmail.com |
| 41 | Mirjam Tamm | TALINNA BOSTANIKAE | mirjam.tamm@bostanikae.ee |
| 42 | Piret Triis | EMU | piret.tris@emu.ee |
| 43 | Riin Doubkay | EMU | riin.doubkay@emu.ee |
| 44 | Eve Ruuno-Pannison | EMU | eve.ruuno-pannison@emu.ee |
| 45 | Kaire Leht | EMU | kaire.leht@emu.ee |

| | Nimi | asutus | kontakt |
|----|----------------------|---------------------------|------------------------------------|
| 46 | Lilja Tamm | Keskonnasamet | lilja.tamm@keskkonnasamet.ee |
| 47 | Ann-Liisa | Keskonnasagentuur | annliisa@keskkonnasamet.ee |
| 48 | PRIT PARD | EMÜ | priti.pard@student.emu.ee |
| 49 | Mardo Mõbas | Eesti Looduskaitse Selts | mardo.mobas@loodus.ee |
| 50 | Karli Ligi | Kõiktooteminiistri büroo | karli.ligi@emu.ee |
| 51 | Hardi Tullus | EMÜ | hardi.tullus@emu.ee |
| 52 | Eda Aiben | EMÜ, spetsialist | eda.aiben@emu.ee |
| 53 | SIRJE TULLUS | EMÜ MIMK | sirje.tullus@emu.ee |
| 54 | MALLE LEH | EMÜ PKI | malle.leh@emu.ee |
| 55 | LEEVI RRUHM | RHK, looduskaitsesektorid | leevi.ruumm@emu.ee |
| 56 | Ylle Lõnn | LÜVA MK | ylle@lva.ee |
| 57 | Enn Dubolazov | Keskonnasamet | enn.dubolazov@keskkonnasamet.ee |
| 58 | Mats Kark | EMÜ | |
| 59 | Katrin Duhnar | LÜVA MK | katrin@lva.ee |
| 60 | Pend. Põrnved | EMÜ | Pend.Pornved@emu.ee |
| 61 | Malle Kuum | EMÜ | malle.kuum@emu.ee |
| 62 | Irma Zetser | EMÜ | irmazetser@gmail.com |
| 63 | Sirje Kaur | Keskonnasamet | sirje.kaur@keskkonnasamet.ee |
| 64 | Merli Hansen | EMÜ | merli.hansen@emu.ee |
| 65 | Riina Kiiker | EMÜ | riina.kiiker@emu.ee |
| 66 | Reimo Lutter | EMÜ | reimo.lutter@emu.ee |
| 67 | Maarit Mägi | EMÜ | maarit.magi@emu.ee |
| 68 | Ida Tõrre | Keskonnasamet | ida.torre@keskkonnasamet.ee |
| 69 | Kaili Viitna | Keskonnasamet | kaili.viitna@keskkonnasamet.ee |
| 70 | Marek Papp | KeA | marek.papp@keskkonnasamet.ee |
| 71 | Tiin Anos | KeA | tiin.anos@keskkonnasamet.ee |
| 72 | Ida Järgendal | KeA | ida.jargendal@keskkonnasamet.ee |
| 73 | Aveli Jaanis | EMÜ | aveli.jaanis@emu.ee |
| 74 | Aivo Vare | RHK | Aivo.Vare@emu.ee |
| 75 | Madis Kullamäe | Keskonnasamet | Madis.Kullamae@keskkonnasamet.ee |
| 76 | Katrin Keldner | KeA | katrin.keldner@keskkonnasamet.ee |
| 77 | Kristina Kapp | EMÜ üliõpilane | kristina.kapp@gmail.com |
| 78 | Mart Breker | Keskonnasamet | mart.breker@keskkonnasamet.ee |
| 79 | Tanel Normann | EMÜS | tanel.normann@gmail.com |
| 80 | Kalle Karolei | Keskonnasagentuur | kalle.karolei@keskkonnasamet.ee |
| 81 | Enn Leedu | EMÜ | enn.leedu@emu.ee |
| 82 | Erli Lõnn | LÜVA MK | erli@lva.ee |
| 83 | Tat. Maafel | EMÜ | tat.maafel@emu.ee |
| 84 | Kaarel Papp | KAUR | Kaarel.Papp@keskkonnasamet.ee |
| 85 | Anneli Laiu | Keskonnasamet | anneli.laiu@keskkonnasamet.ee |
| 86 | MARET LIEKIS | Keskonnasamet | marat.liekis@keskkonnasamet.ee |
| 87 | LIGGI NANN | KeA | liggi.nann@keskkonnasamet.ee |
| 88 | Mareik Michelson | KeA | mareik.michelson@keskkonnasamet.ee |
| 89 | Dea James | PMA | dea.james@pma.agri.ee |
| 90 | Max Kinkor | PMA | max.kinkor@pma.agri.ee |
| 91 | Taru Põrnved | TLU | taru.pornved@tlu.ee |
| 92 | Pille Herikmaa | TBA | hille.herikmaa@keskkonnasamet.ee |
| 93 | Ann Kaur | TBA | ann.kaur@keskkonnasamet.ee |
| 94 | MARIA BRIZMER | PMA | maria.brizmer@pma.agri.ee |

| | Nimi | asutus | kontakt |
|-----|----------------|---------------------|-----------------------------|
| 95 | BRITTY RUIDET | EESTI MAAILIKOOL | brtoppuudet@gmail.com |
| 96 | GUNNAR HOROZOV | EESTI MAAILIKOOL | GUNNAR.HOROZOV@EMAIL.COM |
| 97 | Hardo Beeton | EMU | hardo.beeton@emu.ee |
| 98 | Taru Aasaar | EMU | taru.aasaar@emu.ee |
| 99 | Liina Jäms | EMU | liina.jams@emu.ee |
| 100 | Grete Lõhmuse | EMU | grete.lohmuse@emu.ee |
| 101 | Mari Kaarto | EMU | maris.kaarto@emu.ee |
| 102 | Rein Kallaste | Metsaõu | rein.kallaste@metsaõu.ee |
| 103 | Mari Aho | Metsaõu | mari.aho@metsaõu.ee |
| 104 | Sulev Põllu | Talvemuuseum | sulev.põllu@talvemuuseum.ee |
| 105 | Ilmo Kivistik | Tartu Metsaõu Selts | ilmo.kivistik@tms.ee |
| 106 | Taru Kaarto | EMU | taru.kaarto@emu.ee |
| 107 | Piret Kõrre | SA Jäms | piret.korre@jams.ee |
| 108 | Mari Kaarto | EMU | maris.kaarto@emu.ee |
| 109 | Olari Vilam | Sakala Metsaõu | olari.vilam@sakala.ee |
| 110 | Pille Udam | EMU | pillu.udam@emu.ee |
| 111 | MAILI LEOL | HALJASTAJA OÜ | maili.leol@haljastaja.ee |
| 112 | Taru Dreukhan | EMU | taru.dreukhan@emu.ee |
| 113 | Mari Kaarto | EMU | maris.kaarto@emu.ee |
| 114 | | | |
| 115 | | | |
| 116 | | | |
| 117 | | | |
| 118 | | | |
| 119 | | | |
| 120 | | | |
| 121 | | | |
| 122 | | | |
| 123 | | | |
| 124 | | | |
| 125 | | | |
| 126 | | | |
| 127 | | | |
| 128 | | | |
| 129 | | | |
| 130 | | | |
| 131 | | | |
| 132 | | | |
| 133 | | | |
| 134 | | | |
| 135 | | | |
| 136 | | | |
| 137 | | | |
| 138 | | | |
| 139 | | | |
| 140 | | | |
| 141 | | | |
| 142 | | | |
| 143 | | | |